

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossijskij bioterapevticeskij zurnal

Российский Биотерапевтический Журнал
2025 • том 24 • № 3



**Russian Journal
of Biotherapy**

3

TOM/VOL. 24
2025

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal

теоретический и научно-практический рецензируемый журнал

Основная задача издания – публикация информации о современных достижениях в области изучения патогенеза, диагностики и терапии иммуноопосредованных и онкологических заболеваний, результатов научных исследований, национальных и международных доклинических и клинических исследований.

Цели журнала – информирование читателя о результатах изучения новых биомаркеров онкологических и иммуноопосредованных заболеваний, использования биомаркеров в диагностике и терапии злокачественных новообразований и патологий иммунной системы, исследований в области лекарственной и клеточной терапии, а также по вопросам технологии создания лекарств, биомедицинских клеточных продуктов и биоматериалов, проведения доклинических и клинических исследований новых препаратов и методов лечения; обобщение научных и практических достижений в области диагностики и терапии иммунологических и онкологических заболеваний.

ОСНОВАН В 2002 г. профессором А.Ю. Барышниковым

3 ^{ТОМ 24}
'25

Учредитель:

ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Адрес учредителя и редакции:
115478, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 2.

Тел.: +7 (499) 324-10-65
Факс: +7 (499) 324-22-74

E-mail: bioterapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Адрес издательства:

115478, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 15, НИИ
канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Редактор Ю.Н. Бирюкова
Корректор Т.Н. Помилуйко

Дизайн: Е.В. Степанова
Верстка: О.В. Гончарук

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций. Регистрационный
номер: № 77-11695 от 21.01.2002,
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013.*

При полной или частичной
перепечатке материалов
ссылка на журнал «Российский
биотерапевтический журнал»
обязательна.

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)

Российский биотерапевтический журнал.
2025. Том 24. № 3. 1–92.

© Оформление, верстка.

ООО «ИД «АБВ-пресс», 2025

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» — 81679.

Отпечатано в типографии «Лайдер принт».

105082, Москва, Переведеновский пер., 13, стр. 16.

Тираж 1000 экз. Бесплатно.

<http://bioterapevt.elpub.ru>

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Киселевский Михаил Валентинович, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Караулов Александр Викторович, академик РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Шпрах Зоя Сергеевна, д.фарм.н., заведующая лабораторией химико-фармацевтического анализа ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, профессор кафедры фармации Института фармации им. П.А. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Соколова Зинаида Александровна, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Балдуева Ирина Александровна, д.м.н., доцент, заведующая научным отделом онкоиммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Бунятян Наталья Дмитриевна, д.фарм.н., профессор, главный научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, профессор кафедры фармации Института фармации им. П.А. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Евсегнеева Ирина Валентиновна, д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Краснов Виктор Павлович, член-корреспондент РАН, д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией асимметрического синтеза Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН (Екатеринбург, Россия)

Курбатова Екатерина Алексеевна, д.м.н., профессор, заведующая лабораторией терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия)

Меерович Игорь Геннадьевич, к.б.н., научный сотрудник департамента фармации Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Каламазу, США)

Мисюрин Андрей Витальевич, д.б.н., генеральный директор ООО «Генотехнология» (Москва, Россия)

Набиев Игорь Руфаилович, д.х.н., профессор, профессор лаборатории по исследованиям в области нанонаук Реймского университета (Реймс, Франция), ведущий ученый лаборатории нанобиоинженерии Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (Москва, Россия)

Новиков Виктор Владимирович, д.б.н., профессор, профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, заведующий лабораторией иммунохимии ФБУН «Нижегородский Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» (Нижний Новгород, Россия)

Оборотова Наталья Александровна, д.фарм.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Панкратов Андрей Александрович, к.б.н., руководитель отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии Московского научного исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Петров Александр Юрьевич, д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации и химии Уральского государственного медицинского университета (Екатеринбург, Россия)

Рапопорт Наталья Яковлевна, д.х.н., профессор, почетный профессор департамента биомедицинской инженерии Университета Юты (Солт-Лейк-Сити, США)

Соколова Татьяна Михайловна, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., советник вице-президента РАН (Москва, Россия)

Титов Константин Сергеевич, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник ГБУЗ «Московский многопрофильный научно-клинический центр им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы», профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики им. академика В.П. Харченко Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», президент АНО «Национальный альянс специалистов по опухолям наружных локализаций» (Москва, Россия)

Уласов Илья Валентинович, д.б.н., ведущий научный сотрудник, лидер группы экспериментальной биотерапии и диагностики Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Эстрин Юрий Захарович, д.ест.н., почетный доктор РАН, действительный член Австралийской академии наук, иностранный член РАН, профессор департамента материаловедения и инжиниринга Университета им. Монаша (Клэйтон, Австралия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Барышникова Мария Анатольевна, к.фарм.н., заведующая лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Бочарова Ольга Алексеевна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией иммунофармакологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Демидов Лев Вадимович, д.м.н., профессор, заведующий хирургическим отделением № 10 биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Иванов Павел Константинович, д.м.н., заведующий лабораторией медицинской биотехнологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кадагидзе Заира Григорьевна, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник централизованного клинико-лабораторного отдела ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Косоруков Вячеслав Станиславович, к.б.н., директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Шубина Ирина Жановна, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses). Journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

Russian Journal of Biotherapy

Peer-reviewed theoretical and SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

The main objective of Russian Journal of Biotherapy is a publication of current achievements in the study of pathogenesis, diagnostics, and therapy of immune-mediated and oncological diseases, results of the research studies, and results of national and international pre-clinical and clinical studies.

The publication aim is to present the results of the studies of new biomarkers of oncological and immune diseases, the use of biomarkers in diagnostics and therapy of tumors and disorders of the immune system, studies in the field of drug and cell therapy, studies of drug development technologies, biomedical cell products and biomaterials, pre-clinical and clinical studies of new medicines and methods of treatment. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of immunological and oncological diseases therapy.

FOUNDED IN 2002 by Professor A.Yu. Baryshnikov

3^{VOL. 24}
'25

Founder:

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation

Founder and editorial office:

Bld. 2, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478.

Tel.: +7 (499) 324-10-65
Fax: +7 (499) 324-22-74

e-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Publishing office:

Research Institute of Carcinogenesis, Floor 3, Bld. 15, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478.

Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Editor **Yu.N. Biriukova**
Proofreader **T.N. Pomiluyko**
Designer **E.V. Stepanova**
Maker-up **O.V. Goncharuk**

The journal is registered at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media
Registration number: ПИИ № 77-11695 dated 21.01.2002;
ПИИ № ФС77-53039 dated 04.03.2013

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Rossijskij bioterapevticeskij zhurnal".

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)

Rossijskij bioterapevticeskij zhurnal. 2025. Volume 24. No 3. 1–92.

© Design, layout PH "ABV-Press", 2025

Rospechat' catalogue index: 81679.
Printed at the Leader Print Ltd
Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane, Moscow 105082.

1,000 copies. Free distribution

<http://bioterapevt.elpub.ru>

EDITOR-IN-CHIEF

Kiselevskiy, Mikhail V., PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

DEPUTIES EDITOR-IN-CHIEF

Karaulov, Alexander V., Academician of the Russian Academy of Sciences, PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Shprakh, Zoya S., PhD, DSc, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, Head of Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Analysis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Professor of Chair of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Sokolova, Zinaida A., PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Balduueva, Irina A., PhD, DSc, Associate Professor, Head of Research Department of Oncoimmunology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

Bunyatyan, Natalia D., PhD, DSc, Professor, Major Researcher of Center of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of Russia, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Evseegneeva, Irina V., MD, PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Krasnov, Viktor P., PhD, DSc, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Major Researcher, Head of Laboratory of Asymmetrical Synthesis, I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (Ekaterinburg, Russia)

Kurbatova, Ekaterina A., PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Therapeutic Vaccines, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

Meerovich, Igor G., PhD, Scientist II of Pharma Department, Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Kalamazoo, USA)

Misyurin, Andrey V., PhD, DSc, General Director of LLC "Gene Technology" (Moscow, Russia)

Nabiev, Igor R., PhD, DSc, Professor, Professor of Laboratory of Studies in the Field of Nanoscience, University of Reims (Reims, France), Leading Scientist of Laboratory Nanobioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute) (Moscow, Russia)

Novikov, Viktor V., PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Molecular Biology and Immunology of the Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky Nizhegorodsky State University, Head of Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Nizhniy Novgorod, Russia)

Oborotova, Natalia A., PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of Laboratory of Development of Drug Forms, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Pankratov, Andrey A., PhD, Chief of Department of Modifiers and Protectors of Anti-tumor Therapy, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Petrov, Alexander Yu., PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Pharmacy, Ural's State Medical University (Ekaterinburg, Russia)

Rapoport, Natalya Ya., PhD, DSc., Research Professor Emerita, Department of Biomedical Engineering, University of Utah (Salt Lake City, USA)

Sokolova, Tatiana M., PhD, DSc, Leading Researcher of Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Stepanova, Eugenia V., PhD, DSc, Advisor to the Vice-President of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

Titov, Konstantin S., MD, PhD, DSc, Professor, Leading researcher at the Moscow Multidisciplinary Scientific and Clinical Center named after S.P. Botkin of the Moscow Department of Health, Professor of the Department of Oncology and Radiology named after Academician V.P. Kharchenko of the Medical Institute of the Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, President of the National Alliance of Specialists in Tumors of External Localization (Moscow, Russia)

Ulasov, Ilya V., PhD, DSc, Leading Researcher, Leader of the Experimental Biotherapy and Diagnostics Group of the Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Estrin, Yuri Z., PhD, DSc, Honorary Doctor of the Russian Academy of Sciences, Fellow of the Australian Academy of Science, Foreign member of the Russian Academy of Sciences, Professor of Department of Materials Science and Engineering, Monash University (Clayton, Australia)

EDITORIAL COUNCIL

Baryshnikova, Maria A., PhD, Head of Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Bocharova, Olga A., PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Immunopharmacology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Demidov, Lev V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of Surgical Department No 10 of Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Ivanov, Pavel K., PhD, DSc, Head of Laboratory of Medical Biotechnology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Kadagidze, Zaira G., MD, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of Centralized Clinical-Laboratory Department, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Kosorukov, Vyacheslav S., PhD, Director of Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Kubasova, Irina Yu., PhD, Scientific Registrar, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Shubina, Irina Zh., PhD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

С.С. Шушанов, А.Р. Гизатуллин, Ю.Б. Черных, Т.А. Захарова, Н.П. Акентьева Глюкозозависимый синтез аденозинтрифосфорной кислоты и экспрессия транспортёров GLUT в миеломных клетках RPMI8226	10
Е.А. Курбатова, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Д.С. Воробьев, Е.С. Петухова, И.Б. Семенова, А.Е. Зайцев, Ю.В. Волох, Н.О. Вартанова, А.В. Поддубиков, О.М. Афанасьева, А.В. Зубков Нейтрализующая способность моноклональных антител, направленных к эпитопам функционально значимого домена пневмолизина <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
М.Г. Хотулева, Я.О. Садовская, А.О. Каримова, Н.Е. Варламов, Д.А. Хоченков, М.В. Миронова, Д.В. Гусев, О.Н. Солопова Получение и характеристика моноклональных антител к ферропортину человека	29
Н.К. Марынич, А.В. Гавшина, И.Г. Меерович Модификация красного флуоресцентного белка TagRFP для уменьшения его иммуногенности при создании флуоресцирующих модельных опухолей иммунокомпетентных мышей <i>Balb/C</i>	36
М.П. Киселева, И.С. Голубева, Л.М. Борисова, Г.Б. Смирнова, Ю.А. Борисова, А.В. Ланцова, Д.В. Гусев, З.С. Шпрах Новое производное N-гликозида индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1269, обладающее противоопухолевой активностью на перевиваемых опухолях мышей	45
С.В. Тишков, Е.В. Блынская, К.В. Алексеев, В.Л. Дорофеев Оптимизация процесса влажной грануляции методом поверхностного отклика при получении таблеток ГСБ-106	53
В.Н. Блиндарь, И.А. Климанов Анемический синдром у больных раком прямой кишки	63
Е.А. Пасечникова, А.Ю. Георгиева, В.Н. Бодня, Д.В. Кадомцев, В.А. Порханов, А.А. Веревкин, С.Д. Максименко Прогностическое значение экспрессии маркеров E-кадгерина и TWIST в первичных опухолевых блоках пациентов с меланомой кожи ранних стадий и распространенным раком прямой кишки: влияние на прогноз заболевания и эффективность проводимого лечения.	70
С.В. Чулкова, Н.А. Купрышина, А.А. Семенова, О.П. Колбацкая, Г.С. Тумян Детекция минимальной остаточной болезни после индукционной химиотерапии и аутоТГСК и ее клиническое значение при множественной миеломе.	83
 ЮБИЛЕЙ	
К юбилею Михаила Валентиновича Киселевского	92

ORIGINAL REPORTS

<i>Sain S. Shushanov, Artur R. Gizatullin, Yulia B. Chernykh, Tatiana A. Zakharova, Natalia P. Akentieva</i>	
Glucose-dependent adenosine triphosphate synthesis and GLUT transporter expression in RPMI8226 myeloma cells	10
<i>Ekaterina A. Kurbatova, Irina V. Yakovleva, Natalya F. Gavrilova, Denis S. Vorobyev, Ekaterina S. Petukhova, Irina B. Semenova, Anton E. Zaitsev, Yuri V. Volokh, Nune O. Vartanova, Alexander V. Poddubikov, Olga M. Afanasyeva, Alexander V. Zubkov</i>	
Neutralizing ability of monoclonal antibodies directed to epitopes of functionally significant <i>Streptococcus pneumoniae</i> pneumolysin domain	19
<i>Margarita G. Khotuleva, Yana O. Sadovskaya, Anastasia O. Karimova, Nikolay E. Varlamov, Dmitry A. Khochenkov, Maria V. Mironova, Dmitriy V. Gusev, Olga N. Solopova</i>	
Production and characterization of monoclonal antibodies to synthetic human ferroportin peptide	29
<i>Nadezhda K. Marynich, Alexandra V. Gavshina, Irina G. Meerovich</i>	
Modification of the red fluorescent protein TagRFP to reduce its immunogenicity in establishing fluorescent model tumors in immunocompetent <i>Balb/C</i> mice.	36
<i>Marina P. Kiseleva, Irina S. Golubeva, Larisa M. Borisova, Galina B. Smirnova, Julia A. Borisova, Anna V. Lantsova, Dmitriy V. Gusev, Zoya S. Shprakh</i>	
A new indolo[2,3-a]carbazole N-glycoside derivative LCS-1269 with antitumor activity on transplantable mice tumors	45
<i>Sergey V. Tishkov, Evgenia V. Blynskaya, Konstantin V. Alekseev, Vladimir L. Dorofeev</i>	
Optimization of wet granulation by surface response method in obtaining GSB-106 tablets	53
<i>Valentina N. Blindar, Igor A. Klimanov</i>	
Anemic syndrome in patients with rectal cancer	63
<i>Elizaveta A. Pasechnikova, Anastasiia Yu. Georgieva, Vadim N. Bodnya, Dmitry V. Kadomtsev, Vladimir A. Porkhanov, Alexandr A. Verevkin, Sofia D. Maksimenko</i>	
Prognostic significance of TWIST and E-cadherin expression in primary tumor blocks of patients with early-stage melanoma and locally advanced rectal cancer: impact on disease outcome and therapy effectiveness	70
<i>Svetlana V. Chulkova, Natalia A. Kupriyshina, Anastasiya A. Semenova, Olga P. Kolbatskaya, Gayane S. Tumyan</i>	
Detection of minimal residual disease after induction chemotherapy and autologous HSCT and its clinical significance in multiple myeloma	83

JUBILEE

To mark the anniversary of Mikhail Valentinovich Kiselevsky	92
--	-----------

Глюкозозависимый синтез аденозинтрифосфорной кислоты и экспрессия транспортеров GLUT в миеломных клетках RPMI8226

С.С. Шушанов¹, А.Р. Гизатуллин², Ю.Б. Черных³, Т.А. Захарова¹, Н.П. Акентьева²

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН»;

Россия, 142432 Московская область, Черноголовка, пр-кт Академика Семенова, 1;

³ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; Россия, 129110 Москва, ул. Щепкина, 61/2

Контакты: Саин Сакенович Шушанов sainHershy@yandex.ru

Введение. Глюкоза – один из основных источников энергии в клетках. Потребление глюкозы раковыми клетками заметно выше по сравнению с нормальными клетками и усиливается по мере злокачественного прогрессирования. Начальным этапом метаболизма глюкозы является ее транспорт через плазматическую мембрану, который опосредуется семейством транспортеров глюкозы GLUT. Исследование механизмов активации GLUT представляет собой многообещающий подход к дифференциальному блокированию регулируемого глюкозой метаболизма в раковых клетках. В данной работе мы исследовали зависимость эффективности синтеза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и регуляции экспрессии генов классических «переносчиков глюкозы» *GLUT1* – *GLUT4* от количества глюкозы в культуральной среде в миеломных клетках человека RPMI8226.

Цель исследования – изучение влияния глюкозы на синтез АТФ и регуляцию экспрессии генов – транспортеров глюкозы *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*, *GLUT4* в клетках множественной миеломы человека RPMI8226.

Материалы и методы. В работе использовали линию миеломных клеток человека RPMI8226. Жизнеспособность клеток оценивали колориметрическим методом. Влияние глюкозы на синтез АТФ в клетках определяли люминесцентным методом. Экспрессию матричной РНК в клетках изучали методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. В ходе исследования установлено, что синтез АТФ в клетках RPMI8226 зависит от метаболизма глюкозы. Снижение жизнеспособности клеток RPMI8226 строго коррелирует со снижением содержания ново-синтезируемой АТФ. Для указанной линии клеток характерна относительно высокая исходная экспрессия гена *GLUT1* и гена *GLUT3*, относительно умеренная – гена *GLUT2*, и относительно слабая – гена *GLUT4*. Исследования по депривации глюкозы выявили активацию экспрессии всех указанных генов транспортеров глюкозы, однако наиболее высокая экспрессия была характерна для генов *GLUT2* и *GLUT4*.

Заключение. На основании исследования мы заключаем, что для миеломных клеток RPMI8226 глюкоза является одним из важных источников энергии. Экспрессия генов транспортеров глюкозы *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*, *GLUT4* зависит от концентрации глюкозы, однако исходный уровень экспрессии не предсказывает характер ее изменений при глюкозной депривации.

Ключевые слова: синтез аденозинтрифосфорной кислоты, экспрессия матричной РНК, транспортер глюкозы GLUT

Для цитирования: Шушанов С.С., Гизатуллин А.Р., Черных Ю.Б. и др. Глюкозозависимый синтез аденозинтрифосфорной кислоты и экспрессия транспортеров GLUT в миеломных клетках RPMI8226. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):10–8.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-10-18>

Glucose-dependent adenosine triphosphate synthesis and GLUT transporter expression in RPMI8226 myeloma cells

Sain S. Shushanov¹, Artur R. Gizatullin², Yulia B. Chernykh³, Tatiana A. Zakharova¹, Natalia P. Akentieva²

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences; 1 Akademika Semenova Prospekt, Chernogolovka, Moscow region 142432, Russia;

³M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute; 61/2 Shchepkin St., Moscow 129110, Russia

Contacts: Sain Sakenovich Shushanov sainHershy@yandex.ru

Background. Glucose is one of the main sources of energy in cells. Glucose consumption by cancer cells is markedly higher compared to normal cells and increases with malignant progression. The initial step in glucose metabolism is its transport across the plasma membrane, which is mediated by the GLUT family of glucose transporters. Although patterns of GLUT gene expression in cancer have already been identified, studying the mechanisms of their activation represents a promising approach to differentially block glucose-regulated metabolism in cancer cells. In this work, we investigated the dependence of the efficiency of adenosine triphosphate (ATP) synthesis and the regulation of the expression of the genes of classical “glucose transporters” GLUT1–GLUT4 on the amount of glucose in the culture medium.

Aim. Study of glucose-dependent ATP synthesis and expression of glucose transporter genes: GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, involved in glucose transport in human myeloma cells RPMI8226.

Materials and methods. The human myeloma cell line RPMI8226 was used in this work. Cell viability was assessed using a colorimetric method. The effect of glucose on ATP synthesis in cells was determined using the luminescent method. The expression of mRNA in cells was studied using real-time quantitative polymerase chain reaction.

Results. The study found that ATP synthesis in RPMI8226 cells depends on glucose metabolism. Decreased viability of RPMI8226 cells strongly correlates with decreased levels of newly synthesized ATP. This cell line is characterized by relatively high initial expression of the GLUT1 gene and the GLUT3 gene, relatively moderate expression of the GLUT2 gene, and relatively weak expression of the GLUT4 gene. Studies on glucose deprivation revealed activation of the expression of all these glucose transporter genes, but the highest expression was characteristic of the GLUT2 gene and GLUT4 gene.

Conclusion. Based on the study, we conclude that for RPMI8226 myeloma cells, glucose is one of the important sources of energy metabolism. Expression of glucose transporter genes: GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 depends on glucose concentration, but the initial level of expression does not predict the nature of its changes during glucose deprivation.

Keywords: adenosine triphosphate synthesis, mRNA expression, GLUT glucose transporter

For citation: Shushanov S.S., Gizatullin A.R., Chernykh Yu.B. et al. Glucose-dependent adenosine triphosphate synthesis and GLUT transporter expression in RPMI8226 myeloma cells. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(3):10–8. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-10-18>

Введение

Глюкоза является одним из основных источников энергии в клетках, используется в качестве субстрата для синтеза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) посредством гликолиза и окислительного фосфорилирования. АТФ — универсальный источник энергии для всех биохимических процессов, протекающих в клетке. Время жизни 1 молекулы АТФ <1 мин, поэтому ее синтез в клетке происходит непрерывно [1].

Потребление глюкозы раковыми клетками заметно выше по сравнению с нормальными клетками и усиливается по мере злокачественного прогрессирования, что в значительной степени способствует их росту и пролиферации [2–4]. Хотя картина метаболизма опухолевых клеток еще далека от завершения, сегодня предпринимаются попытки повысить

эффективность лечения рака в виде стратегии, получившей название «метаболическая терапия». Противоопухолевая метаболическая терапия предполагает использование небольших молекул, способных специфично ингибировать ключевые метаболические реакции, ассоциированные с опухолевым ростом. Таким образом, изменение энергетического метаболизма в опухолевых клетках может служить мишенью в противоопухолевой терапии, при которой комбинация традиционных химиотерапевтических лекарственных средств и модуляторов метаболизма может повысить эффективность противоопухолевой терапии [5].

Множественная миелома (ММ) представляет собой злокачественное новообразование, характеризующееся клональной пролиферацией антителообразующих

плазматических клеток, которые развиваются из дифференцирующихся В-клеток, изначально характеризующихся низкой метаболической активностью. Дифференцировка В-клеток в плазматические клетки требует увеличения поглощения глюкозы и синтеза АТФ для пролиферации и подготовки к выработке антител [6]. Изменение метаболической активности клеток ММ ассоциируется с изменением регуляции экспрессии генов и белков, участвующих в биоэнергетике и биосинтезе [7]. Например, показано, что в плазматических клетках, полученных от пациентов с впервые диагностированной ММ, гены, участвующие в метаболизме глюкозы, активированы по сравнению с их состоянием в плазматических клетках, полученных от здоровых доноров, и их активность продолжает расти в плазматических клетках больных ММ с рецидивом по сравнению с их активностью в плазматических клетках недавно диагностированных больных ММ [8].

Ключевым этапом потребления глюкозы является транспорт глюкозы через плазматическую мембрану в цитозоль, который опосредуется семейством транспортеров глюкозы (GLUT) [2–4]. На основании гомологии в аминокислотной последовательности и структурного сходства транспортеры глюкозы объединены в 3 класса. В I класс входят транспортеры GLUT1, GLUT2, GLUT3 и GLUT4, которые известны как классические «переносчики глюкозы» и наиболее хорошо изучены [2, 3]. Хотя закономерности экспрессии транспортеров глюкозы при раке уже идентифицированы, однако исследование взаимосвязи между изменением метаболической активности клеток ММ и активностью генов *GLUT* остается актуальным.

Цель исследования — изучение влияния глюкозы на синтез АТФ и регуляцию экспрессии генов транспортеров глюкозы *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*, *GLUT4* в клетках ММ человека RPMI8226.

Материалы и методы

Линии клеток множественной миеломы

В работе использована линия клеток ММ человека, RPMI8226, которая была выведена из образца костного мозга больного ММ. Эта линия клеток получена из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Способ культивирования: суспензионный в среде RPMI1640 с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой (FBS) при температуре 37 °C, 5 % CO₂. Линия клеток RPMI8226 является широко известной и часто используемой для изучения биологии ММ. Она фенотипически охарактеризована (для нее четко установлены критерии дифференцировки [9]) и доказана ее миеломная природа. В этой линии клеток с использованием количественной полимеразной цепной

реакции (ПЦР) в реальном времени мы предварительно исследовали экспрессию генов транспортеров глюкозы *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*, *GLUT4* и по количеству циклов ПЦР установили, что эти гены имеют средний уровень экспрессии, что является основным критерием выбора клеточной линии RPMI8226 в качестве модели для исследования.

Оценка жизнеспособности клеток множественной миеломы колориметрическим методом

Для определения жизнеспособности клеток мы использовали колориметрический метод — МТТ-тест, основанный на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток превращать «желтый» МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид — в «синий» формазан. Клетки RPMI8226 засевали в 96-луночные планшеты с плотностью 20×10^3 клеток на лунку в 3 повторях в 150 мкл среды с сывороткой, содержащей 25 мМ глюкозы (контроль), или без глюкозы. Эти условия повторяли для бессывороточной среды. После инкубации в течение 72 ч в каждую лунку добавляли 20 мкл МТТ (исходная концентрация — 5 мг/мл) и клетки инкубировали при температуре 37 °C еще 4 ч. Через указанное время удаляли среду и добавляли 60 мкл диметилсульфоксида на лунку для растворения осадка. Для гомогенного распределения красителя качали на шейкере в течение 3 мин при 300 об/мин. Анализ проводили на цитофотометре «Унискан» («Пикон», Россия) при фильтре 595 нм. Жизнеспособность клеток оценивалась сопоставлением оптической плотности в экспериментальных лунках с оптической плотностью в контрольных лунках. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM).

Исследование глюкозозависимого синтеза аденозинтрифосфорной кислоты в клетках RPMI8226

Влияние глюкозы на синтез АТФ в клетках определяли люминесцентным методом с использованием набора АТФ-Glo™ («Аксиома БИО», Россия) согласно инструкции. План эксперимента был выполнен с модификацией в соответствии с исследованием [10]. Клетки RPMI8226 дважды отмывали от сыворотки и глюкозы средой без сыворотки и глюкозы. После каждой промывки клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 5 мл среды без сыворотки в присутствии 5 мМ глюкозы (низкое содержание глюкозы) и инкубировали в течение 12 ч с целью истощения АТФ. Через 12 ч клетки тщательно отмывали от глюкозы средой без сыворотки и глюкозы и делили поровну на 2 части, далее осаждали и супернатант сливали. Затем к 1-й части осажденных клеток

добавляли среду без сыворотки и глюкозы (контроль), а ко 2-й части осажденных клеток добавляли среду без сыворотки с 25 мМ глюкозы (высокое содержание глюкозы), пипетировали и вносили в лунки 96-луночного планшета по 100 мкл (5 лунок). Затем клетки инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 мин. По истечении 30 мин в каждую лунку вносили по 5 мкл АТФ-Glo-коктейля и измеряли интенсивность люминесценции на спектрофлуориметре Multiskan FC 357–908226 (Thermo Fisher Scientific, США) при $E_{ex}/E_{em} = 546/620$ нм. Расчет общего количества АТФ проводили на основе построенной калибровочной стандартной кривой. Данные представлены как среднее значение 3 повторных экспериментов.

Выделение РНК из клеток множественной миеломы и синтез комплементарной ДНК

Для выделения тотальной РНК к осадку клеток добавляли 1 мл тризола (TRIzol, Sigma-Aldrich, США). Процедуру выделения РНК проводили согласно стандартному протоколу. Концентрацию РНК определяли по оптическому поглощению при λ 260 нм. Электрофорез выделенной РНК проводили в 1 % агарозном геле при напряжении 100 В в течение 30–40 мин. Качество РНК оценивали по наличию полос рибосомальной РНК. Реакционная смесь для синтеза первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) содержала 2 мкг тотальной РНК, 4 мкл 5X реакционного буфера (Fermentas, США), 1 мкл (0,5 мкг) праймеров Oligo (dT)₁₈ (Fermentas, #S0131, США), 1 мкл 25 мМ смеси dNTP (Thermo Fisher Scientific, #R1121, США), 0,5 мкл (20 ед.) ингибитора РНКаз RiboLock™ (Fermentas, #EO0381, США), 1 мкл (200 ед.) обратной транскриптазы RevertAid™ M–MuLV (Fermentas, #EP0441, США). Объем смеси составлял 25 мкл. Син-

тез первой цепи кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) при 42 °С в течение 60 мин.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Определение экспрессии матричной РНК (мРНК) генов *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*, *GLUT4* в линиях клеток проводили с помощью Real-time PCR на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, США). Использовался набор реагентов для количественной ПЦР Cat#R-412 (Syntol, Россия). Смесь для ПЦР состояла из dNTP, 10X PCR-буфера, ДНК-полимеразы SynTaq, MgCl₂, красителя SYBR Green, 10 пмоль прямого и обратного праймеров, кДНК образцов и дважды дистиллированной H₂O в общем объеме 20 мкл. Условия ПЦР были следующими: реакцию проводили при температуре 95 °С в течение 5 мин и 40 циклов при температуре 95 °С в течение 15 с, затем при температуре 60 °С в течение 25 с и температуре 72 °С – в течение 25 с. В данных условиях амплификация не наблюдалась в контрольных образцах без матрицы или без обратной транскрипции. Специфичность продукта амплификации определяли путем анализа кривой плавления для каждой пары праймеров. Данные были проанализированы с помощью сравнительного метода СТ (cycle threshold), а кратность изменения была рассчитана с помощью метода $2^{-\Delta\Delta CT}$. Для нормализации эффективности синтеза кДНК использовали амплификацию референсного гена *β-Actin*. Все образцы анализировали в 3 повторях и использовали средние значения экспрессии. В табл. 1 показаны используемые последовательности олигонуклеотидных праймеров и ссылка на источник нуклеотидной последовательности исследуемого гена

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, из Национального центра биотехнологической информации (NCBI)

Table 1. Nucleotide sequences of primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction from the National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Ген Gene	Последовательность прямого (F)/обратного (R) праймеров (5'–3') Forward (F)/Reverse (R) primer sequence (5'–3')	Ссылка на источник последовательности нуклеотидов гена из NCBI NCBI reference sequence
<i>GLUT-1</i>	F: CTTCACTGTCGTGTCGCTGT R: TGAAGAGTTCAGCCACGATG	NM_006516.2
<i>GLUT-2</i>	F: GGT TTGTA ACTTATGCCTAAG R: GCCTAGTTATGCATTGCAG	NM_000340.1
<i>GLUT-3</i>	F: GACCCAGAGATGCTGTAATGGT R: GACCCAGTGTTGTAGCCAA	NM_006931.2
<i>GLUT-4</i>	F: GCCATGAGCTACGTCTCCATT R: GGCCACGATGAACCAAGGAA	M20747.1
<i>β-Actin</i>	F: AGCCATGTACGTTGCTATCCA R: ACCGGAGTCCATCACGATG	NM_001101.3

из NCBI — базы данных Национального центра биотехнологической информации.

Статистическая обработка данных

Данные представлены как среднее значение 3 повторных экспериментов. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software Inc., США). Статистическую значимость различий в жизнеспособности клеток и синтезе АТФ определяли с применением критерия *t*-тест. Статистическую значимость различий в уровне экспрессии генов определяли с использованием *U*-критерия Манна–Уитни (непараметрического критерия). Значения представлены как среднее (*M*) ± стандартная ошибка среднего (SEM). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На I этапе нашего исследования мы оценили то, как влияет сыворотка (FBS) на чувствительность глюкозозависимой жизнеспособности клеток RPMI8226. МТТ-тест показал, что депривация глюкозы приводит к заметному снижению жизнеспособности клеток как в присутствии FBS, так и в ее отсутствие. Так, в присутствии FBS и в отсутствие глюкозы средняя жизнеспособность клеток RPMI8226 снизилась до 59,1 % (рис. 1, *a*), а в отсутствие и FBS, и глюкозы средняя жизнеспособность клеток RPMI8226 снизилась до 13,7 % (рис. 1, *б*). Таким образом, полученный результат свидетельствует о том, что депривация глюкозы в отсутствие FBS приводит к более выраженному (в 4,3 раза) снижению жизнеспособности клеток RPMI8226.

На следующем, II этапе мы оценили, как влияет FBS на глюкозозависимое количество АТФ в клетках RPMI8226. Наши данные показали, что в клетках RPMI8226 депривация глюкозы в присутствии FBS и в отсутствие глюкозы приводит к снижению количества АТФ до 47,3 % (рис. 2, *a*), а в отсутствие и FBS, и глюкозы — до 5,0 % (рис. 2, *б*). Таким образом, полученный результат свидетельствует о том, что депривация глюкозы в отсутствие FBS приводит к более выраженному (в 9,5 раза) снижению количества АТФ.

Таким образом, данные, полученные на этом этапе исследований, позволяют нам утверждать, что ответ клеток RPMI8226 на депривацию глюкозы (снижение жизнеспособности и уменьшение количества АТФ) является более чувствительным в условиях отсутствия FBS. Важно также отметить, что отсутствие FBS исключает участие жирных кислот в метаболизме [11–14], что позволяет адекватно исследовать роль глюкозы в синтезе АТФ и регуляции экспрессии генов — транспортеров глюкозы. Именно поэтому последующие эксперименты мы проводили в условиях отсутствия FBS.

На III этапе мы исследовали глюкозозависимый синтез АТФ в клетках RPMI8226 в течение 30 мин (дизайн эксперимента подробно описан в разделе «Материалы и методы»). Наши исследования показали, что в течение 30 мин количество АТФ при концентрации глюкозы 25 мМ увеличилось в 2 раза по сравнению с таковым при концентрации глюкозы 0 мМ (контроль). Эти данные свидетельствуют о том, что синтез АТФ в клетках RPMI8226 зависит от метаболизма глюкозы.

Известно, что в миеломных клетках, кроме глюкозы и жирных кислот, в синтезе АТФ участвует

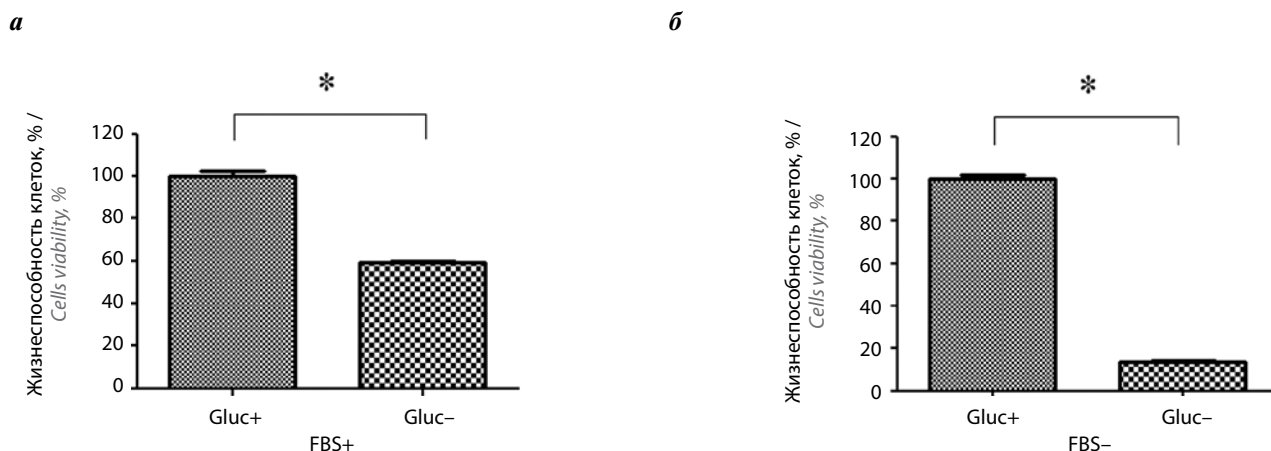


Рис. 1. Глюкозозависимая жизнеспособность клеток RPMI8226 в присутствии (*a*) и отсутствии (*б*) FBS. Депривация глюкозы в отсутствие FBS по сравнению с присутствием FBS показала снижение глюкозозависимой жизнеспособности клеток RPMI8226 в 4,3 раза. МТТ-тест, 72 ч.

* $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой (Gluc+); Gluc — глюкоза; FBS — фетальная бычья сыворотка

Fig. 1. Glucose-dependent viability of RPMI8226 cells in the presence (*a*) or absence (*б*) of FBS. Glucose deprivation in the absence of FBS compared with the presence of FBS showed a 4.3-fold decrease in glucose-dependent viability of RPMI8226 cells. MTT assay, for 72 h

* $p < 0.001$ vs control group (Gluc+); Gluc — glucose; FBS — fetal bovine serum

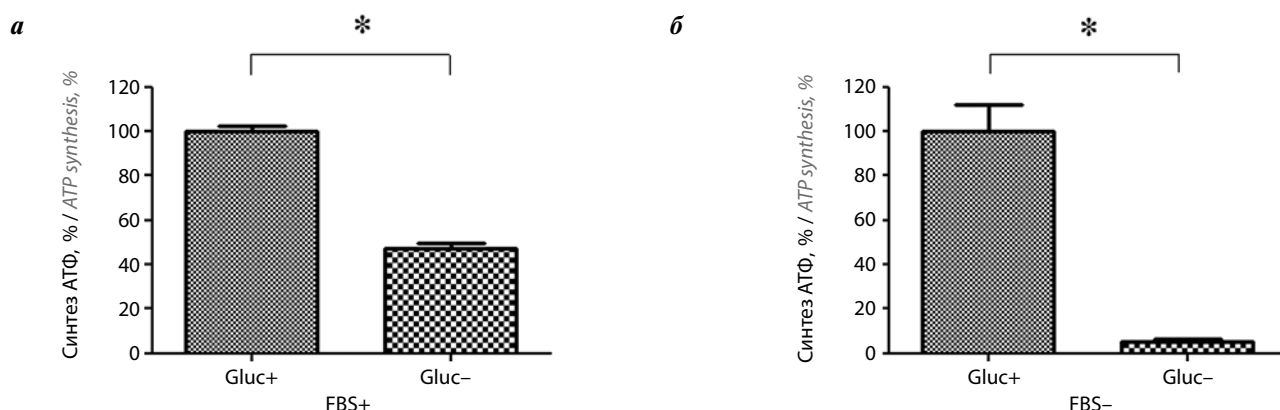


Рис. 2. Глюкозозависимое количество аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в клетках RPMI8226 в присутствии (а) или в отсутствие (б) FBS. Депривация глюкозы в течение 72 ч в отсутствие FBS по сравнению с его присутствием приводит к снижению количества АТФ в клетках RPMI8226 в 9,5 раза

* $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой (Gluc+); Gluc – глюкоза; FBS – фетальная бычья сыворотка

Fig. 2. Glucose-dependent amount of adenosine triphosphate (ATP) in RPMI8226 cells in the presence (a) or absence (b) of FBS. Glucose deprivation for 72 h in the absence of FBS compared with its presence resulted in a 9.5-fold decrease in ATP levels in RPMI8226 cells

* $p < 0.001$ compared to the control mixture (Gluc+); Gluc – glucose; FBS – fetal bovine serum

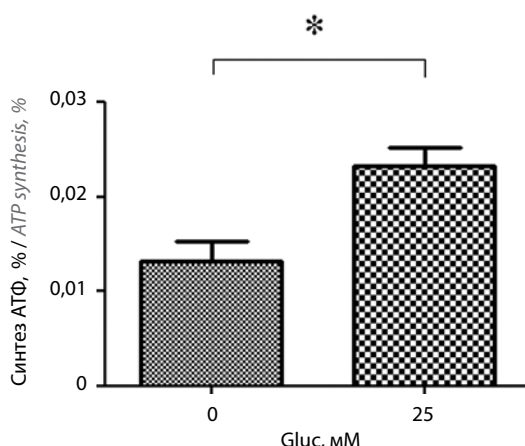


Рис. 3. Глюкозозависимый синтез аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в клетках RPMI8226 в отсутствие (контроль) или в присутствии глюкозы (Gluc) в течение 30 мин

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (Gluc+)

Fig. 3. Glucose-dependent adenosine triphosphate (ATP) synthesis in RPMI8226 cells in the absence (control) or presence of glucose (Gluc) after 30 min

* $p < 0.05$ vs control group (Gluc+)

глутамин [11–14]. В наших исследованиях глутамин присутствовал в культуральной среде и его роль в синтезе АТФ не исследовалась.

Ранее было показано, что в костном мозге миеломные клетки, в отличие от нормальных плазматических клеток, демонстрируют повышенное поглощение глюкозы [4] и что метаболизм глюкозы им необходим для аэробного гликолиза и окислительного фосфорилирования, а в конечном счете — для синтеза АТФ — источника энергии для поддержания повышенных уровней синтеза и секреции антител [12]. При этом обнаружено, что гены, участ-

вующие в метаболизме глюкозы, активируются в плазматических клетках у пациентов с впервые диагностированной ММ по сравнению с больными с впервые диагностированной ММ [8]. Как сказано ранее, начальным этапом метаболизма глюкозы является его транспорт через плазматическую мембрану, который опосредуется семейством транспортеров глюкозы GLUT.

В данной работе мы исследовали роль глюкозы в регуляции экспрессии генов *GLUT1–GLUT4* как возможного механизма активации транспортеров глюкозы в миеломных клетках. Значения экспрессии генов мы оценивали с помощью ПЦР в реальном времени.

На начальном этапе мы определили исходный уровень экспрессии мРНК генов *GLUT1–GLUT4* и установили, что для клеток RPMI8226 характерна относительно высокая экспрессия мРНК генов *GLUT1* ($11,0 \pm 0,6$) и *GLUT3* ($12,9 \pm 0,3$), относительно умеренная — гена *GLUT2* ($5,4 \pm 0,5$) и относительно слабая — гена *GLUT4* ($1,0 \pm 0,5$). Значения экспрессии мРНК генов *GLUT1–GLUT4* были нормализованы к значениям экспрессии мРНК гена *GLUT4*.

В ответ на депривацию глюкозы выявлена активация экспрессии мРНК всех 4 исследуемых генов — транспортеров глюкозы. Наиболее активно реагировали на снижение уровня глюкозы гены *GLUT2* ($6,17 \pm 2,08$) и *GLUT4* ($7,98 \pm 2,92$) (табл. 2).

Из данных литературы известно, что транспортер GLUT2 присутствует в β -клетках островков поджелудочной железы, где он участвует в стимулируемой глюкозой секреции инсулина [15]. В печени GLUT2 вовлечен в механизмы регуляции генов физиологического контроля, чувствительных к глюкозе [15]. В нервной системе GLUT2-зависимая

чувствительность к глюкозе контролирует симпатическую и парасимпатическую активность [15]. Таким образом, экспрессия *GLUT2* характерна для чувствительных к глюкозе клеток, которые активируются либо гипогликемией, либо гипергликемией.

Таблица 2. Зависимость экспрессии мРНК *GLUT1–GLUT4* от депривации глюкозы в клетках RPMI8226

Table 2. Dependence of *GLUT1–GLUT4* mRNA expression on glucose deprivation in RPMI8226 cells

Ген Gene	Gluc+	Gluc–
<i>GLUT1</i>	1,0	2,04 ± 0,36*
<i>GLUT2</i>	1,0	6,17 ± 2,08*
<i>GLUT3</i>	1,0	3,92 ± 1,72*
<i>GLUT4</i>	1,0	7,98 ± 2,92*

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (Gluc+);
Gluc – глюкоза.

* $p < 0,05$ vs control group (Gluc+); Gluc – glucose.

В нашем исследовании мы показали, что, хотя ген *GLUT2* и имеет умеренный исходный уровень экспрессии, при депривации глюкозы (при гипогликемии) экспрессия *GLUT2* ($6,17 \pm 2,08$) значительно увеличивается по сравнению с *GLUT1* ($2,04 \pm 0,36$) и *GLUT3* ($3,92 \pm 1,72$). В соответствующей литературе мы не нашли информацию о влиянии депривации глюкозы на экспрессию мРНК *GLUT2* в миеломных клетках. Однако на основании полученных данных мы пришли к выводу о том, что в клетках RPMI8226 *GLUT2* является наиболее глюкозочувствительным геном (среди генов – транспортеров глюкозы I класса).

Вторым геном (после *GLUT2*), экспрессия которого заметно повысилась при депривации глюкозы, был ген *GLUT4* ($7,98 \pm 2,92$) (см. табл. 2). Интересным является тот факт, что гены *GLUT2* и *GLUT4* исходно слабее экспрессируются, чем *GLUT1* и *GLUT3* (см. табл. 2), однако они демонстрируют значительно большую чувствительность к состоянию депривации глюкозы, чем последние (см. табл. 2). Это свидетельствует о том, что исходные уровни экспрессии генов – транспортеров глюкозы не коррелируют с ответом на депривацию глюкозы.

Белок *GLUT4* был обнаружен в чувствительных к инсулину тканях и играет ключевую роль в поддержании жизнеспособности и пролиферации клеток ММ [14]. Ранее было показано, что в жировых клетках 3T3-L1 [16] и в миоцитах [17] депривация глюкозы не влияет на уровень *GLUT4*. Экспрессия белка *GLUT4* регулируется на уровне транскрипции мРНК гена *GLUT4* [14], т.е. изменение количества белка *GLUT4* положительно коррелирует с изменением

мРНК *GLUT4*. Снижение уровня глюкозы в плазме может быть важным последствием ограничения пищи. Показано, что уровень экспрессии мРНК гена *GLUT4* в сердце снижается при голодании и увеличивается при возобновлении питания [18]. Ограничение еды не влияет на экспрессию мРНК гена *GLUT4* в скелетных мышцах [19]. В условиях гипогликемии уровень экспрессии мРНК гена *GLUT4* в гранулоцитах человека увеличивается, тогда как в моноцитах – остается неизменным [20]. Таким образом, данные литературы свидетельствуют о том, что ген *GLUT4* в разных типах клеток по-разному реагирует на снижение уровня глюкозы. В нашем исследовании мы показали, что в миеломных клетках RPMI8226 в условиях депривации глюкозы экспрессия мРНК гена *GLUT4* увеличивается.

Гены *GLUT1* и *GLUT3* также активируются в ответ на депривацию глюкозы (см. табл. 2). Однако экспрессия мРНК *GLUT1* повышается всего в 2,04 раза, а *GLUT3* – в 3,92 раза (см. табл. 2), хотя средний исходный уровень экспрессии этих генов является высоким (11,0 и 12,9 соответственно) по сравнению со средним исходным уровнем экспрессии *GLUT2* (5,4) и *GLUT4* (1,0). Эти данные также подтверждают то, что исходные уровни экспрессии генов – транспортеров глюкозы в клетке RPMI8226 не коррелируют с ответом на депривацию глюкозы.

Ранее было продемонстрировано, что депривация глюкозы увеличивает экспрессию *GLUT1* в клетках С6 крысы [21], в адипоцитах 3T3-L1 [16] и в миоцитах L6 [22]. *GLUT1* негативно регулируется глюкозой в миоцитах L8 и NIH 3T3 [23].

Было также показано, что депривация глюкозы повышает уровень мРНК и белка *GLUT3* в мозге мышей и первичных культурах нейронов эмбрионов крысы [24], в хромофинных клетках мозгового вещества надпочечников крупного рогатого скота [25], в гранулоцитах и моноцитах [20], в нейронах головного мозга крысы [26].

Таким образом, в ответ на депривацию глюкозы в клетках RPMI8228 выявлена активация экспрессии мРНК всех 4 генов – транспортеров глюкозы: *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3* и *GLUT4*. Наиболее активно реагировали на снижение уровня глюкозы гены *GLUT2* и *GLUT4*, исходный уровень экспрессии которых был ниже, чем экспрессия генов *GLUT1* и *GLUT3* (см. табл. 2). Исследования экспрессии соответствующих белков для транспортеров глюкозы планируются к публикации в будущих работах.

Заключение

Мы исследовали глюкозозависимый синтез АТФ и экспрессию генов – транспортеров глюкозы *GLUT1–GLUT4*, участвующих в переносе глюкозы в миеломных клетках человека RPMI8226. Установили,

что для этой линии клеток характерна высокая исходная экспрессия мРНК гена *GLUT1* и мРНК гена *GLUT3*, умеренная — гена *GLUT2* и слабая — гена *GLUT4*. Мы показали, что синтез АТФ в клетках RPMI8226 зависит от метаболизма глюкозы, что свидетельствует о важной роли глюкозной компоненты наряду с глутаминовой и липидной компонентами, участвующими в синтезе АТФ. Снижение жизнеспособности клеток RPMI8226 строго коррелирует со снижением содержания новосинтезируемой АТФ. В ответ на депривацию глюкозы выявлена активация экспрессии мРНК всех 4 исследуемых генов-транс-

портеров, однако наиболее выраженная экспрессия была характерна для генов *GLUT2* и *GLUT4*, исходный уровень экспрессии которых был ниже, чем экспрессия генов *GLUT1* и *GLUT3*. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что исходная активность отдельно взятых генов-транспортеров не предсказывает ответ на депривацию глюкозы.

Таким образом, гиперэкспрессия генов *GLUT2* и *GLUT4* в отсутствие глюкозы в миеломных клетках RPMI8226 предполагает проведение дополнительных клинических исследований с целью рассмотрения подходов к их дифференциальному блокированию.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Pinna S., Kunz C., Halpern A. et al. A prebiotic basis for ATP as the universal energy currency. *PLOS Biology* 2022;20(10):e3001437. DOI: 10.1371/journal.pbio.3001437
- Adekola K., Rosen S.T., Shanmugam M. Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr Opin Oncol* 2012;24(6):650–4. DOI: 10.1097/CCO.0b013e328356da72
- Rana P.S., Goparaju K., Driscoll J.J. Shutting off the fuel supply to target metabolic vulnerabilities in multiple myeloma. *Front Oncol* 2023;13:1141851. DOI: 10.3389/fonc.2023.1141851
- Wang T., Ma F., Qian H. Defueling the cancer: ATP synthase as an emerging target in cancer therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2021;23:82–95. DOI: 10.1016/j.omto.2021.08.015
- Куликов В.А., Беляева Л.Е. Метаболизм раковой клетки как терапевтическая мишень. *Вестник ВГМУ* 2016;15(6):7–20. DOI: 10.22263/2312-4156.2016.6.7
Kulikov V.A., Belyaeva L.E. Cancer cell metabolism as a therapeutic target. *Vestnik Vitebskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta = Bulletin of Vitebsk State Medical University* 2016;15(6):7–20. (In Russ.). DOI: 10.22263/2312-4156.2016.6.7
- Stein M., Dütting S., Mougiakakos D. et al. A defined metabolic state in pre B cells governs B-cell development and is counterbalanced by swiprosin-2/EFhd1. *Cell Death Differ* 2017;24(7):1239–52. DOI: 10.1038/cdd.2017.52
- Nair R., Gupta P., Shanmugam M. Mitochondrial metabolic determinants of multiple myeloma growth, survival, and therapy efficacy. *Front Oncol* 2022;12:1000106. DOI: 10.3389/fonc.2022.1000106
- Maiso P., Huynh D., Moschetta M. et al. Metabolic signature identifies novel targets for drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Res* 2015;75(10):2071–82. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3400
- Pellat-Deceunynck C., Amiot M., Bataille R. et al. Human myeloma cell lines as a tool for studying the biology of multiple myeloma: a reappraisal 18 years after [letter]. *Blood* 1995;86:4001–2.
- McGuire C.M., Forgac M. Glucose starvation increases V-ATPase assembly and activity in mammalian cells through AMP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *J Biol Chem* 2018;293(23):9113–23. DOI: 10.1074/jbc.RA117.001327
- Yoon H., Shaw J.L., Haigis M.C., Greka A. Lipid metabolism in sickness and in health: emerging regulators of lipotoxicity. *Mol Cell* 2021;81(18):3708–30. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.08.027
- Torcasio R., Cantafio M.E.G., Ikeda R.K. et al. Lipid metabolic vulnerabilities of multiple myeloma. *Clin Exp Med* 2023;23(7):3373–90. DOI: 10.1007/s10238-023-01174-2
- Matsumoto T., Jimi S., Migita K. et al. Inhibition of glucose transporter 1 induces apoptosis and sensitizes multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents. *Leuk Res* 2016;41:103–10. DOI: 10.1016/j.leukres.2015.12.008
- McBrayer S.K., Cheng J.C., Singhal S. et al. Multiple myeloma exhibits novel dependence on GLUT4, GLUT8, and GLUT11: implications for glucose transporter directed therapy. *Blood* 2012;119(20):4686–97. DOI: 10.1182/blood-2011-09-377846
- Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* 2015;58(2):221–32. DOI: 10.1007/s00125-014-3451-1
- von der Crone S., Deppe C., Barthe A. et al. Glucose deprivation induces Akt-dependent synthesis and incorporation of GLUT1, but not of GLUT4, into the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Cell Biol* 2000;79(12):943–9. DOI: 10.1078/0171-9335-00118
- Baqué S., Montell E., Camps M. et al. Overexpression of glycogen phosphorylase increases GLUT4 expression and glucose transport in cultured skeletal human muscle. *Diabetes* 1998;47(8):1185–92. DOI: 10.2337/diab.47.8.1185
- Hall J.R., Short C.E., Driedzic W.R. Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *J Exp Biol* 2006;209(Pt 22):4490–502. DOI: 10.1242/jeb.02532
- Takemori K., Kimura T., Shirasaka N. Food restriction improves glucose and lipid metabolism through Sirt1 expression: a study using a new rat model with obesity and severe hypertension. *Life Sci* 2011;88(25-26):1088–94. DOI: 10.1016/j.lfs.2011.04.002
- Korgun E.T., Demir R., Sedlmayr P. et al. Sustained hypoglycemia affects glucose transporter expression of human blood leukocytes. *Blood Cells Mol Dis* 2002;28(2):152–9. DOI: 10.1006/bcmd.2002.0504
- Boado R.J., Pardridge W.M. Glucose deprivation and hypoxia increase the expression of the GLUT1 glucose transporter *via* a specific mRNA cis-acting regulatory element. *J Neurochem* 2002;80(3):552–4. DOI: 10.1046/j.0022-3042.2001.00756.x
- Maher F., Harrison L.C. Stabilization of glucose transporter mRNA by insulin/IGF-1 and glucose deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171(1):210–5. DOI: 10.1016/0006-291x(90)91378-6

23. Wertheimer E., Sasson S., Cerasi E., Ben-Neriah Y. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(6):2525–9. DOI: 10.1073/pnas.88.6.2525
24. Nagamatsu S., Sawa H., Inoue N. et al. Gene expression of GLUT3 glucose transporter regulated by glucose *in vivo* in mouse brain and *in vitro* in neuronal cell cultures from rat embryos. *Biochem J* 1994;300(Pt 1):125–31. DOI: 10.1042/bj3000125
25. Fladeby C., Skar R., Serck-Hanssen G. Distinct regulation of glucose transport and GLUT1/GLUT3 transporters by glucose deprivation and IGF-I in chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1593(2–3):201–8. DOI: 10.1016/s0167-4889(02)00390-7
26. Uehara Y., Nipper V., McCall A.L. Chronic insulin hypoglycemia induces GLUT-3 protein in rat brain neurons. *Am J Physiol* 1997;272(4 Pt 1):E716–9. DOI: 10.1152/ajpendo.1997.272.4.E716

Вклад авторов

С.С. Шушанов, Н.П. Акентьева: разработка концепции и дизайна исследования, сбор, обработка, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование текста рукописи;

Ю.Б. Черных: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи;

А.Р. Гизатуллин, Т.А. Захарова: сбор и обработка данных, редактирование рукописи.

Author's contributions

S.S. Shushanov, N.P. Akentieva: research concept and design, data collection and processing, data analysis and interpretation, article written and editing;

Yu.B. Chernykh: provision of research materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

A.R. Gizatullin, T.A. Zakharova: data collection and processing, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.С. Шушанов / S.S. Shushanov: <https://orcid.org/0000-0002-2273-3024>

А.Р. Гизатуллин / A.R. Gizatullin: <https://orcid.org/0000-0002-5709-7486>

Ю.Б. Черных / Yu.B. Chernykh: <https://orcid.org/0000-0002-7271-1560>

Т.А. Захарова / T.A. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0001-7545-5876>

Н.П. Акентьева / N.P. Akentieva: <https://orcid.org/0000-0002-9126-3070>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации, регистрационный номер НИОКТР 123021600106-6 NUYO-2023-0015 (2023–2025), при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, государственная регистрация № 124020500019-2.

Funding. This work was partially funded by the Ministry of Health of the Russian Federation, project No 123021600106-6 NUYO-2023-0015 (2023–2025), and was partially funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and performed by the state task, state registration No 124020500019-2.

Статья поступила: 23.12.2024. Принята к публикации: 02.07.2025. Опубликовано онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 23.12.2024. Accepted for publication: 02.07.2025. Published online: 25.09.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-19-28>

Нейтрализующая способность моноклональных антител, направленных к эпитопам функционально значимого домена пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*

Е.А. Курбатова, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Д.С. Воробьев, Е.С. Петухова, И.Б. Семенова, А.Е. Зайцев, Ю.В. Волох, Н.О. Варганова, А.В. Поддубиков, О.М. Афанасьева, А.В. Зубков

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А

Контакты: Екатерина Алексеевна Курбатова kurbatova6162@yandex.ru

Введение. Пневмолизин (Ply) – бактериальный холестеролзависимый цитолизин, продуцируемый практически всеми штаммами *Streptococcus pneumoniae*. Антитела, индуцированные к Ply, способны в определенной степени нейтрализовать его патогенное действие на клетки.

Цель исследования – изучить действие моноклональных антител (МкАт), полученных к нативной (натPly) и рекомбинантной (рекPly) формам Ply, на нейтрализацию цитолитической активности бактериального Ply *in vitro* и их превентивные свойства при заражении мышей вирулентным штаммом *S. pneumoniae*.

Материалы и методы. МкАт к натPly- и рекPly-форме получали из асцитной жидкости мышей. Поликлональные антитела ПкАт (рекPly) получали из сыворотки кроликов, иммунизированных рекPly. Ингибирование гемолиза эритроцитов оценивали по минимальной концентрации МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly), предотвращающей лизис эритроцитов, индуцированный натPly. Нейтрализующую способность антител оценивали на клетках яичника китайского хомячка CHO-K1 по минимальной концентрации антител, необходимых для защиты клеток от 4 цитопатогенных доз натPly. Протективные свойства антител исследовали при однократном внутрибрюшинном введении мышам 200 мкг антител с последующим заражением летальной дозой *S. pneumoniae*.

Результаты. Показано, что через 24 ч после внутрибрюшинного введения мышам натPly снижалась масса тела животных и появлялись дегенеративные формы эритроцитов в крови. В опытах *in vitro* натPly вызывал гемолиз эритроцитов и разрушение клеток CHO-K1 по механизму апоптоза. МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) ингибировали гемолиз эритроцитов и нейтрализовали разрушение клеток CHO-K1. Наиболее высокой нейтрализующей активностью характеризовались МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly). Однократное введение мышам исследованных антител вызывало замедление их гибели при заражении штаммом *S. pneumoniae*. Различий в протективной активности антител не выявлено.

Заключение. Методы, основанные на нейтрализации токсического действия Ply *S. pneumoniae* с помощью антител, можно рассматривать как инструмент снижения патогенности пневмококка.

Ключевые слова: моноклональное антитело, пневмолизин, цитолиз, гемолиз, пассивная защита мышей

Для цитирования: Курбатова Е.А., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф. и др. Нейтрализующая способность моноклональных антител, направленных к эпитопам функционально значимого домена пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):19–28.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-19-28>

Neutralizing ability of monoclonal antibodies directed to epitopes of functionally significant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin domain

Ekaterina A. Kurbatova, Irina V. Yakovleva, Natalya F. Gavrilova, Denis S. Vorobyev, Ekaterina S. Petukhova, Irina B. Semenova, Anton E. Zaitsev, Yuri V. Volokh, Nune O. Vartanova, Alexander V. Poddubikov, Olga M. Afanasyeva, Alexander V. Zubkov

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Maly Kazenny Lane, Moscow 105064, Russia

Contacts: Ekaterina Alexeevna Kurbatova kurbatova6162@yandex.ru

Background. Pneumolysin (Ply) – bacterial cholesterol-dependent cytolysin produced by almost all strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antibodies induced to pneumolysin for some extend are able to neutralize its pathogenic effect on cells.

Aim. Investigation of the effect of monoclonal antibodies obtained to native (nPly) and recombinant (rPly) forms of Ply on the neutralization of the cytolytic activity of bacterial Ply *in vitro* and their preventive properties on mice challenged with a virulent strain of *S. pneumoniae*.

Materials and methods. mAbs to the nPly and rPly forms of Ply was obtained from the ascitic fluid of mice. Polyclonal antibodies pAbs (rPly) were obtained from the serum of rabbits immunized with rPly. The inhibition of erythrocyte hemolysis was assessed by the minimum concentration of mAbs (nPly), pAbs (rPly) and pAbs (rPly), which prevents lysis of erythrocytes induced by nPly. The neutralizing ability of antibodies was evaluated on the ovarian cells of the Chinese hamster CHO-K1 by the minimum concentration of antibodies necessary to protect cells from 4 cytopathogenic doses of nPly. The protective properties of the antibodies were studied with a single intraperitoneal injection of 200 µg of antibodies to mice, followed by challenge with a lethal dose of *S. pneumoniae*.

Results. It was shown that 24 hours after intraperitoneal administration of nPly to mice, the body weight of the animals decreased and degenerative forms of red blood cells appeared in the blood. In *in vitro* experiments, nPly caused hemolysis of erythrocytes and destruction of CHO-K1 cells by the mechanism of apoptosis. mAbs (nPly), mAbs (rPly) and pAbs (rPly) inhibited erythrocyte hemolysis and neutralized the destruction of CHO-K1 cells. The highest neutralizing activity was shown by mAbs (rPly) and pAbs (rPly). A single injection of the studied antibodies to mice caused a decrease of their death when infected with the *S. pneumoniae* strain. There were no differences in the protective activity of antibodies.

Conclusion. Methods based on neutralizing the toxic effect of Ply *S. pneumoniae* with the help of antibodies can be considered as a tool to reduce the pathogenicity of pneumococci.

Keywords: monoclonal antibodies, pneumolysin, cytolysis, hemolysis, passive protection of mice

For citation: Kurbatova E.A., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F. et al. Neutralizing ability of monoclonal antibodies directed to epitopes of functionally significant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin domain. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(3):19–28. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-19-28>

Введение

Успехи вакцинопрофилактики заболеваний пневмококковой этиологии не исключают необходимости разработки новых биотерапевтических методов лечения тяжелых случаев заболеваний, вызываемых *Streptococcus pneumoniae*. Одним из основных белковых факторов патогенности пневмококка является пневмолизин (Ply), относящийся к семейству бактериальных холестеролзависимых цитолизин, продуцируемый практически всеми штаммами *S. pneumoniae*. С помощью кристаллографического анализа установлено, что молекула Ply состоит из 4 доменов [1, 2]. Мономеры Ply взаимодействуют с мембраной клеток через домен 4, соединяясь в олигомеры и приводя к критическим структурным изменениям, вызывающим в итоге перфорацию клеточной мембраны [1, 3]. Формируя крупные поры в холестеролсодержащих мембранах клеток, Ply вызывает их гибель, нанося существенный ущерб инфицированному организму хозяина [4, 5]. Специфичные к Ply антитела способны в определенной мере нейтрализовать цитопатогенное действие Ply [6]. Антитела могут напрямую нейтрализовать цитолитическое действие Ply путем блокирования сайтов их связывания с клеткой или путем препятствия олигомеризации протомеров Ply.

Свойства моноклональных антител (МкАт), направленных к различным эпитопам рекомбинантного Ply, охарактеризованы в ряде работ [6–11]. Показано, что МкАт, распознающие эпитопы в домене 4, нейтрализуют цитолитическую активность Ply. Однако свойства МкАт, полученных к нативному пневмолизину (натPly), остаются не до конца исследованными. Это объясняется тем, что на современном этапе получают МкАт к рекомбинантным (рекPly) формам Ply или его фрагментам. Антигенное сходство рекPly и натPly подтверждено в реакции иммуноблоттинга с МкАт к рекPly, способными распознавать натPly, выделенный из клинических штаммов пневмококка [6]. Однако не каждое МкАт подходит для определения Ply в клинических образцах, в том числе методами иммуноферментного анализа (ИФА) [6, 12, 13].

В настоящей работе для оценки функциональной активности Ply-специфичных антител использовали пневмолизин, полученный из бактериальных клеток *S. pneumoniae*, и рекомбинантный атоксичный полноразмерный пневмолизин. Исследована способность МкАт, полученных к натPly- и рекPly-форме, снижать патогенное действие Ply на клетки. Действие МкАт к натPly сравнивали с активностью МкАт и поликлональных антител (ПкАт), полученных к рекPly.

МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) исследовали в опытах пассивной защиты мышей от заражения вирулентным пневмолизинпозитивным штаммом *S. pneumoniae*.

Цель исследования — изучить действие МкАт, полученных к натPly- и рекPly-форме, на нейтрализацию цитолитической активности бактериального Ply *in vitro* и их превентивные свойства при заражении мышей вирулентным штаммом *S. pneumoniae*.

Материалы и методы

Препарат, содержащий натPly, получен с помощью ультразвуковой дезинтеграции бактериальных клеток штамма № 3 *S. pneumoniae* серотипа 3 с последующим осаждением сульфатом аммония [14]. Атоксичный полноразмерный рекPly пневмококка экспрессирован в штамме *Escherichia coli* M-15 [15, 16].

ПкАт (рекPly) получали путем 3-кратной иммунизации кролика дозой 100 мкг рекPly с полным/неполным адъювантом Фрейнда с интервалом 4 нед. Выделение ПкАт (гPly) проводили путем их осаждения из сыворотки крови насыщенным раствором сульфата аммония.

Мыши линии BALB/c, самки, получены из питомника «СМК СТЕЗАР» (г. Владимир). Животных содержали в условиях вивария в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217-2014). Дизайн исследования одобрен этическим комитетом НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 1 от 29.01.2025).

Работа выполнена с использованием научного оборудования и штаммов коллекции центра коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова.

Специфичные к Ply МкАт получали по стандартному протоколу, включающему иммунизацию мышей, культивирование клеток мышинной миеломы P3-X63-Ag8.653, слияние спленоцитов с клетками миеломы (гибридизацию), отбор гибридных клонов, клонирование гибридом, оценку специфичности МкАт к Ply методом непрямого ИФА, определение классов и подклассов продуцируемых МкАт, концентрирование МкАт и их криоконсервацию [17]. Особенностью отбора клонов продуцентов МкАт (натPly) явилось определение специфичности антител в ИФА при адсорбции на планшетах натPly и параллельная оценка способности МкАт (натPly) ингибировать гемолитическую активность натPly. Выделение МкАт из асцитной жидкости мышей проводили методом двукратного осаждения сульфатом аммония. Осадок растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), диализовали против того же буфера и затем концентрировали с помощью полиэтиленгликоля с молекулярной массой 40 000 [14].

Оценку гемолитической активности натPly проводили в 96-луночных круглодонных микропланшетах для иммунологических реакций (Thermo Fisher Scientific, США). Препарат, содержащий натPly, титровали двукратным шагом в ФСБ в объеме 25 мкл с последующим добавлением 25 мкл 1,25 % эритроцитов крови лошади. Планшеты инкубировали при температуре 37 °C в течение 30 мин. За отрицательный результат принимали концентрацию натPly, вызывающую гемолиз 50 % эритроцитов. Концентрацию натPly, вызывающую полный гемолиз эритроцитов в предшествующей отрицательному результату лунке, принимали за 1 гемолитическую единицу (ГЕ).

При постановке реакции ингибирования гемолиза эритроцитов исследуемые антитела титровали в объеме 25 мкл двукратным шагом. Затем в каждую лунку прибавляли 1 ГЕ натPly в объеме 25 мкл. После инкубации планшета в течение 30 мин при 37 °C во все лунки прибавляли по 25 мкл суспензии эритроцитов. В контрольные лунки с рабочей концентрацией натPly прибавляли вместо антител по 25 мкл ФСБ. Планшет инкубировали в течение 2 ч при температуре 37 °C. Результат учитывали визуально. Протективным титром считали разведение антител, при котором гемолиз эритроцитов был полностью нейтрализован. Исследование проводили в 4 повторах.

Нейтрализацию цитопатогенного действия натPly с помощью исследуемых антител оценивали на культуре пролинизависимых эпителиоподобных клеток яичника китайского хомячка СНО-K1. Первоначально определяли 1 цитопатогенную дозу натPly [4]. Для этого в лунки 96-луночного культурального микропланшета вносили по 100 мкл серийных двукратных разведений натPly начиная с концентрации 2 мг/мл. Затем в каждую лунку прибавляли по 10⁴ клеток СНО-K1 в объеме 100 мкл. Планшеты инкубировали при температуре 37 °C в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 5 % концентрации CO₂. Результаты учитывали через 48 ч с помощью инвертированного микроскопа (Leitz, Германия). За 1 цитопатогенную единицу (ЦПЕ) принимали наименьшую концентрацию натPly, индуцирующую полное разрушение клеток, которая составляла 100 мкг/мл натPly. Для оценки способности антител нейтрализовать токсическое действие натPly на клетки СНО-K1 в первые лунки планшета вносили исследуемые антитела начиная с концентрации 4 мг/мл в объеме 100 мкл, и проводили их титрование двукратным шагом. Далее во все лунки планшета прибавляли 4 ЦПД натPly (400 мкг/мл) в объеме 50 мкл. Планшет инкубировали при температуре 37 °C в CO₂-инкубаторе в течение 30 мин. Затем прибавляли клетки СНО-K1 в указанной концентрации и инкубировали в течение 48 ч. В качестве отрицательного контроля вместо антител использовали серийные двукратные разведения

ФСБ в RPMI-1640. Оценку целостности клеток проводили через 48 ч после инкубации. Микрофотографии получали с помощью инвертированного микроскопа (Leica DMI8, Leica, Германия) с программным обеспечением LAS V4.12; объектив 10 × окуляр 10, увеличение 100. Размер изображения 1245 × 93,75 мкм.

Превентивные свойства МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) исследовали при однократном внутрибрюшинном введении мышам 200 мкг исследуемых антител в объеме 0,5 мл. В качестве контроля использовали нормальный иммуноглобулин (Ig) мыши (Calbiochem, США) в той же концентрации. Через 1 ч мышей заражали внутрибрюшинно летальной дозой (10^5 микробных клеток) штамма № 3 *S. pneumoniae* серотипа 3 в объеме 0,5 мл. Наблюдение за животными проводили в течение 8 сут. Учитывали количество выживших мышей в опытных и контрольной группах.

Статистическую обработку данных проводили методом Манна–Уитни для независимых выборок при использовании программного обеспечения Statistica 10. Данные представлены средним значением $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Для оценки токсического действия пневмолизина мышам однократно внутрибрюшинно вводили препарат, содержащий натPly, в дозах 25, 50 и 100 мкг на мышь в объеме 0,5 мл; контрольной группе животных вводили 0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций в том же объеме.

Через 1 сут после введения натPly отмечали снижение массы тела мышей во всех опытных группах

по сравнению с контролем. В ходе дальнейшего наблюдения масса мышей не отличалась от контрольных значений. Различий в массе тела мышей в диапазоне доз от 25 до 100 мкг/мышь натPly не выявлено.

В этот же срок (через 24 ч) у мышей исследовали морфологию эритроцитов в мазках крови из хвостовой вены. С увеличением дозы отмечено появление в крови дегенеративных форм эритроцитов (рис. 1, а–в). Значительные изменения морфологии эритроцитов наблюдали при введении дозы 100 мкг, которые характеризовались появлением большого количества акантоцитов – эритроцитов с зоной просветления в центре и с неровными зубчатыми выростами цитоплазмы (рис. 1, в).

Для оценки функциональной активности МкАт, специфичных к натPly и рекPly, использовали метод ингибирования гемолиза эритроцитов, вызываемого натPly. Результаты сравнивали с активностью ПкАт (рекPly).

Для определения 1 ГЕ натPly разводили до заранее оттитрованной концентрации, составляющей 0,76 мкг/лунка и делали двукратно уменьшающиеся разведения в ФСБ в лунках круглодонного микропланшета. После этого в лунки прибавляли 1,5 % суспензию эритроцитов. Инкубировали при температуре 37 °C в течение 30 мин. Концентрация натPly, равная 0,76 мкг/лунка, вызывала 100 % лизис эритроцитов (рис. 2, а). В 2 раза меньшая концентрация (0,39 мкг/лунка) натPly индуцировала 50 % лизис эритроцитов. На основании этого за 1 ГЕ принимали концентрацию натPly 0,76 мкг/лунка. Эту концентрацию использовали при оценке ингибирующей активности антител (рис. 2, б). Для этого проводили титрование антител в двукратных разведениях. Затем во все

Таблица 1. Динамика массы тела мышей после однократного внутрибрюшинного введения нативного пневмолизина (натPly)

Table 1. Dynamics of body weight of mice after a single intraperitoneal injection of native pneumolysin (nPly)

Доза препарата Drug dose	Масса мышей, г Mice weight, g					
	до введения before injection	после введения натPly, сут after injection of nPly, days				
		1	2	3	4	6
натPly, мкг/0,5 мл nPly, µg/0,5 mL						
25	14,4 ± 0,2	12,7 ± 0,1*	14,4 ± 0,2	15,6 ± 0,2	16,5 ± 0,2	20,9 ± 0,2
50	14,0 ± 0,2	13,2 ± 0,3*	13,4 ± 0,4	14,4 ± 0,2	15,2 ± 0,2	18,1 ± 0,3
100	14,3 ± 0,2	12,5 ± 0,3*	14,4 ± 0,2	15,5 ± 0,4	16,1 ± 0,2	20,0 ± 0,3
0,9 % раствор натрия хлорида (контроль), 0,5 мл 0.9 % sodium chloride solution (control), 0.5 mL	14,7 ± 0,2	14,4 ± 0,3	14,5 ± 0,2	15,5 ± 0,2	16,3 ± 0,2	20,8 ± 0,2

*Достоверность различий между опытными группами и контролем, $p < 0,05$.

*Significance of differences between experimental groups and the control, $p < 0.05$.

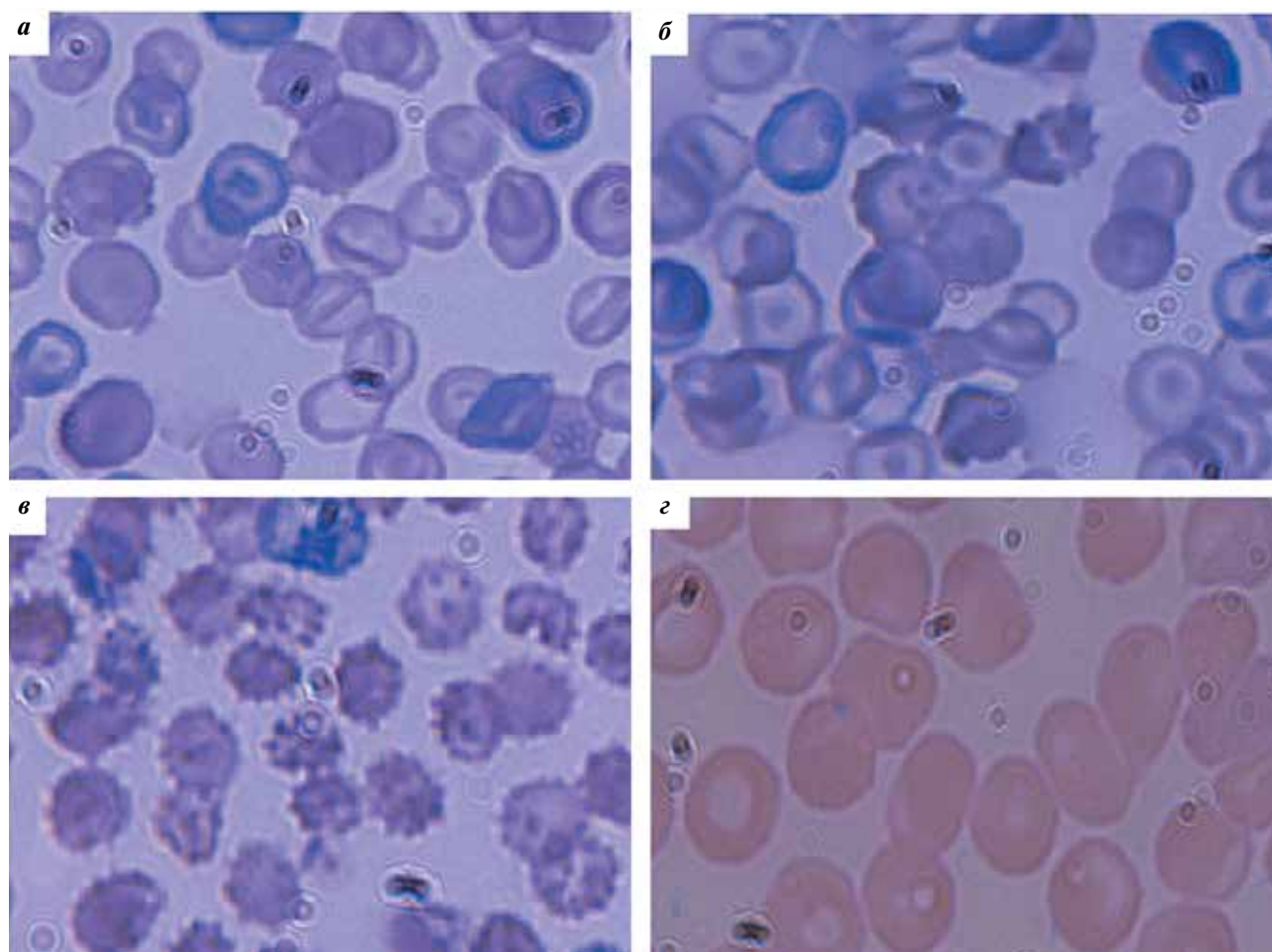


Рис. 1. Морфология эритроцитов мышей через 24 ч после внутрибрюшинного введения нативного пневмолизина. Доза препарата, мкг/мышь: а – 25; б – 50; в – 100; г – 0,9 % раствор натрия хлорида (контроль). Окраска мазков крови по Романовскому–Гимзе. Световая микроскопия, иммерсия, $\times 90$

Fig. 1. Morphology of mouse red blood cells 24 hours after intraperitoneal administration of native pneumolysin. Drug dose, $\mu\text{g}/\text{mouse}$: а – 25; б – 50; в – 100; г – 0.9 % sodium chloride solution (control). Blood smears stained by Romanowsky–Giemsa. Light microscopy, immersion, $\times 90$

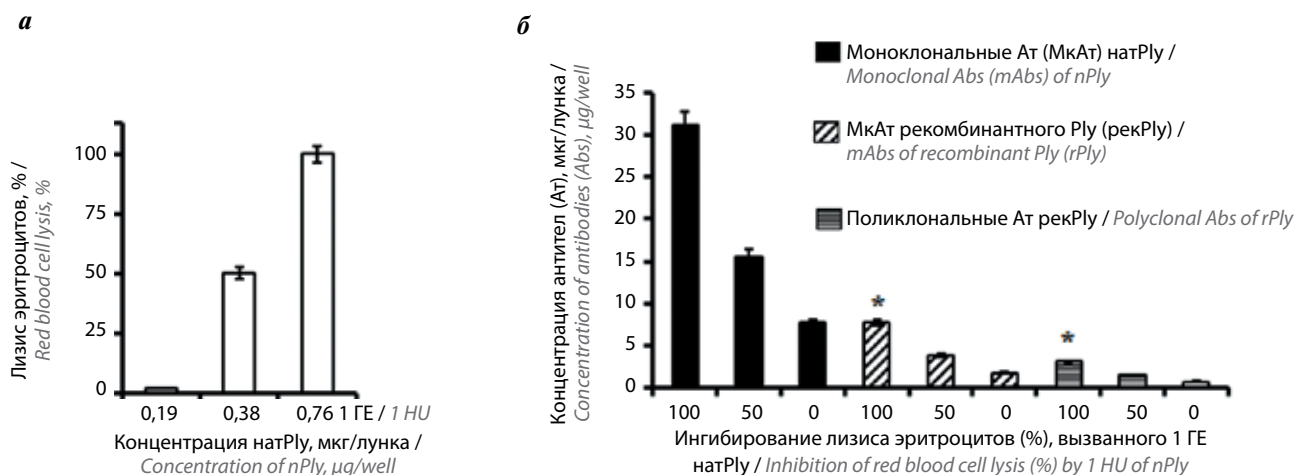


Рис. 2. Ингибирование лизиса эритроцитов: а – расчет концентрации нативного (натPly) пневмолизина (Ply), вызывающей 100 % лизис эритроцитов; б – концентрация антител, вызывающая ингибирование 1 гемолитической единицы (ГЕ) натPly

Fig. 2. Inhibition of red blood cell lysis: а – the calculation of the concentration of native (nPly) pneumolysin (Ply), which causes 100 % lysis of erythrocytes; б – the concentration of antibodies, which causes the inhibition of 1 hemolytic unit (HU) of nPly

лунки планшета прибавляли 1 ГЕ натPly, инкубировали и вносили эритроциты. 100 % ингибирование гемолиза при прибавлении МкАт (натPly) составляло 32 мкг/лунка; для МкАт (рекPly) требовалась меньшая концентрация антител — 7,0 мкг/лунка; для ПкАт (рекPly) ингибирующая концентрация составляла 3,2 мкг/лунка.

Во 2-м варианте опытов оценивали нейтрализующее действие антител при внесении 4 ЦПД натPly в культуру клеток СНО-К1. Результаты учитывали с помощью световой микроскопии (рис. 3). Принцип метода был таким же, то есть к МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly), взятым в двукратных разведениях, прибавляли 4 ЦПД натPly и затем вносили культуру клеток СНО-К1 (см. рис. 3, А–В, а–д). Контрольные лунки вместо антител содержали среду культивирования и 4 ЦПД натPly (см. рис. 3, А–В, е). Во всех контрольных лунках натPly вызывал фрагментацию клеток с образованием окруженных мембраной апоптотических телец, состоящих из цитоплазмы и плотно расположенных органелл [18].

МкАт (натPly) в концентрациях 4 и 2 мг/мл нейтрализовали действие натPly на клетки (рис. 3, А). При концентрации МкАт (натPly) 1 мг/мл появлялись первые признаки изменения морфологии клеток, сопровождающиеся их округлением; при концентрации 0,5 мг/мл обнаруживали мелкие округлые клетки и единичные клетки нормальной формы; концентрация 0,25 мкг/мл уже не защищала клетки от разрушающего действия натPly. Таким образом, минимальная нейтрализующая концентрация МкАт (натPly) составляла 2 мг/мл. МкАт (рекPly) вызывали сходные изменения морфологии клеток. При этом минимальная нейтрализующая концентрация антител была меньше и составляла 1 мг/мл (см. рис. 3, Б). Минимальная нейтрализующая концентрация ПкАт (рекPly) составляла 0,5 мг/мл (рис. 3, В).

Для оценки способности антител защищать мышей от заражения вирулентным штаммом *S. pneumoniae* за 1 ч до заражения им однократно внутривенно вводили исследуемые антитела в концентрации 200 мкг/мышь. В качестве контроля использовали нормальный Ig мыши в той же концентрации (рис. 4).

Гибель мышей, зараженных летальной дозой *S. pneumoniae* серотипа 3, начиналась на 2-е сутки после введения бактериальной культуры. В контрольной группе мышей, получивших нормальный Ig, на 2-е сутки погибло 4 из 8 мышей, тогда как во всех опытных группах — по 1 из 8 мышей. На 3-и сутки наблюдения в контрольной группе осталась в живых 1 особь, тогда как в группах мышей, которым вводили МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly), — 6, 4 и 5 мышей соответственно. Начиная с 4-х суток различия между опытными группами мышей были

несущественными. К 6-м суткам все контрольные мыши погибли, а в опытных группах оставалось в живых по 1 особи. На 7-е и 8-е сутки последовательно погибли мыши, которым вводили МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) и осталась в живых только 1 особь, получившая МкАт (натPly), т.е. однократное введение МкАт и ПкАт, специфичных к Ply, вызывало замедление гибели мышей. Полученные предварительные результаты, выявившие тенденцию протективного действия антител *in vivo*, подтверждают результаты опытов *in vitro* по нейтрализации цитопатогенного действия натPly на клетки с помощью антител, но нуждаются в дальнейшем выборе оптимальных доз и схемы пассивной иммунизации мышей.

Заключение

В ранее проведенных нами исследованиях показано, что иммунизация мышей рекPly приводила к образованию анти-рекPly-антител и защищала мышей от заражения *S. pneumoniae* [19]. Это явилось основанием для оценки нейтрализующей активности МкАт, направленных к функционально значимым эпитопам молекулы Ply. Так как использованный в работе рекомбинантный полноразмерный Ply не оказывал цитопатогенного действия в опытах *in vitro* и *in vivo* [16], для оценки нейтрализующей способности антител использовали натPly, полученный из бактериальных клеток *S. pneumoniae* [4]. Показано, что натPly обладал токсичностью, вызывая быстрое (через 24 ч) снижение массы тела мышей, что сопровождалось появлением в крови мышей морфологически измененных и дегенеративных форм эритроцитов. В тестах *in vitro* исследована пневмолизин-нейтрализующая способность 2 мышинных моноклональных IgG-антител, одно из которых получено к натPly-форме, другое — к рекPly-формам, а также ПкАт, индуцированных к рекPly. Показано, что МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) обладали способностью ингибировать гемолиз эритроцитов, т.е. были направлены к домену 4 молекулы Ply, ассоциированного с гемолитической активностью [6]. В тесте нейтрализации цитопатогенного действия Ply на клетки яичника китайского хомячка СНО-К1 установлены протективные свойства всех исследованных антител в ответ на прямое действие высокой концентрации натPly на клетки СНО-К1, защищающее клетки от апоптоза, вызванного действием пневмолизина. Таким образом, в 2 разных опытах, проведенных *in vitro*, показана способность МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) защищать от разрушения клетки, подвергнутые действию натPly. Более высокая функциональная активность МкАт (рекPly) по сравнению с МкАт (натPly) зависела от клона-продуцента МкАт [13]. Следует отметить, что функционально активные МкАт (рекPly) могут

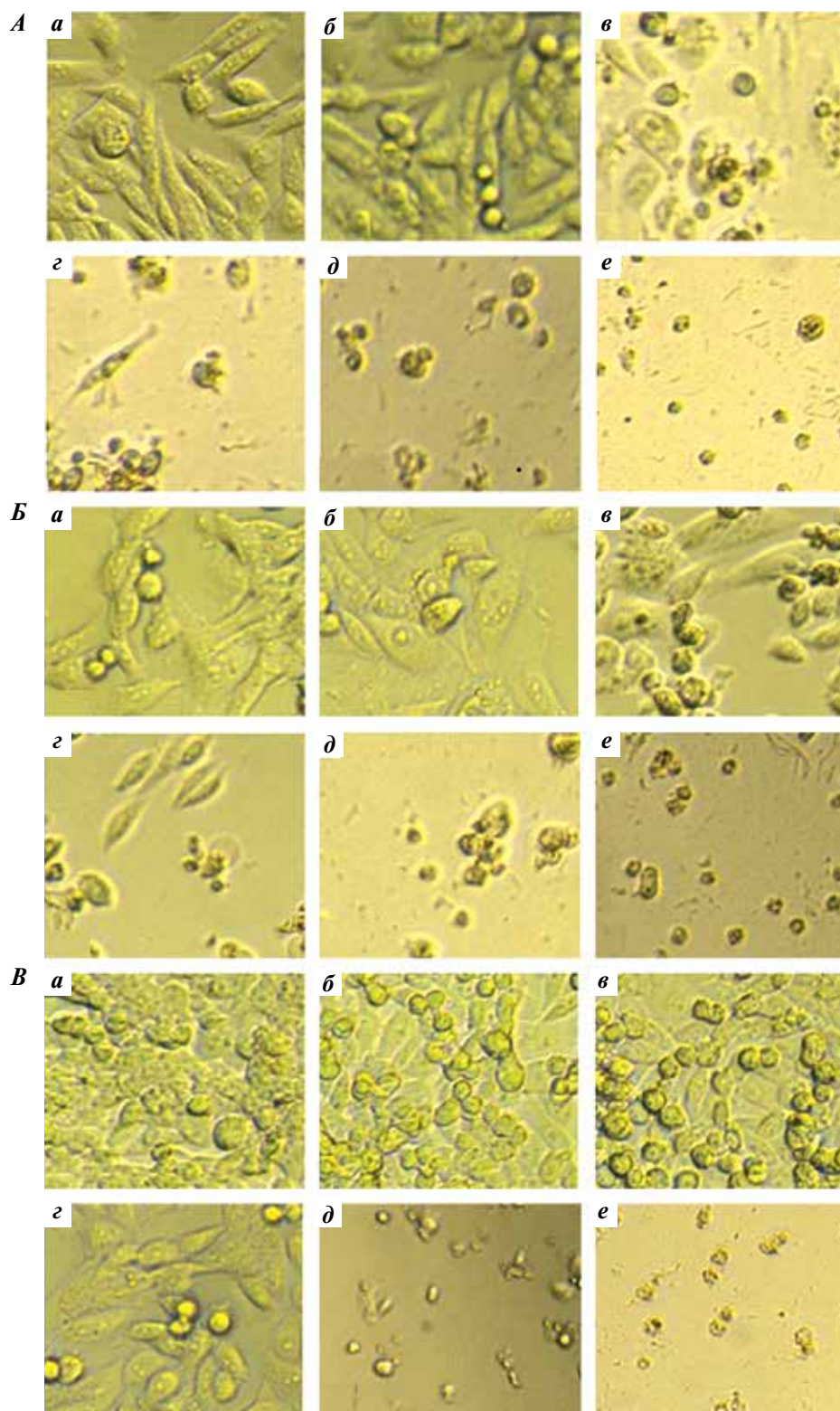


Рис. 3. Нейтрализация цитопатогенного действия нативного (натPly) пневмолизина (Ply) (4ЦПД) на клетки CHO-K1 с помощью моноклональных (МкАм) антител (Ам): А – МкАм (натPly); Б – МкАм рекомбинантного Ply (рекPly); В – поликлональные Ам (рекPly). Концентрация Ам: а – 4 мг/мл; б – 2 мг/мл; в – 1 мг/мл; г – 0,5 мг/мл; д – 0,25 мг/мл; е – контроль, среда культивирования. Увеличение 100, объектив $\times 10$, окуляр 10

Fig. 3. Neutralization of the cytopathogenic effect of native (nPly) pneumolysin (Ply) (4 cytopathogenic doses) on CHO-K1 cells using monoclonal (mAbs) antibodies (Abs): А – mAbs (nPly); Б – mAbs recombinant Ply (rPly); В – polyclonal Abs (rPly). Abs concentration: а – 4 mg/mL; б – 2 mg/mL; в – 1 mg/mL; г – 0.5 mg/mL; д – 0.25 mg/mL; е – control, culture medium. Magnification 100, lens $\times 10$, eyepiece 10

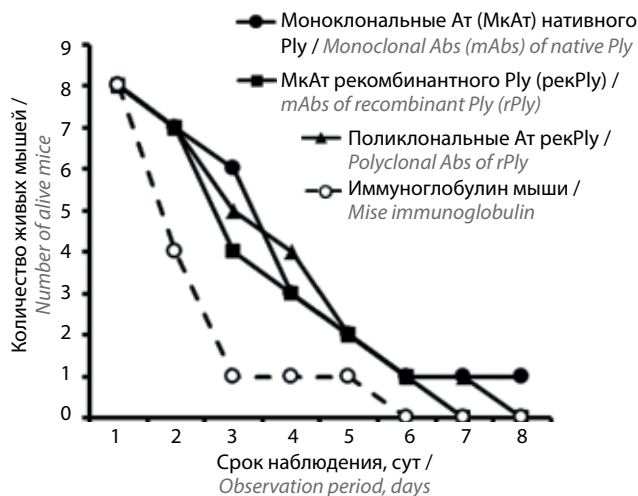


Рис. 4. Превентивные свойства антител (Ат), специфичных к пневмолизину (Ply)

Fig. 4. Preventive properties of antibodies (Abs) specific to pneumolysin (Ply)

не распознавать и слабо распознавать натPly в иммунохимических тестах (непрямой и сэндвич-ИФА), взаимодействуя при этом с натPly в реакции иммуноблоттинга [4, 6, 13]. Результаты, свидетельствующие о протективной активности антител в опытах

in vitro, подтвердились в опытах *in vivo*. Все исследованные антитела при пассивном введении мышам за 1 ч до заражения вирулентным штаммом *S. pneumoniae* снижали его патогенное действие, что проявлялось в замедлении гибели опытных мышей по сравнению с контролем. Полученные предварительные данные по превентивной активности антител требуют подтверждения с использованием других доз антител и схем их введения мышам.

На основании проведенных нами исследований установлено, что МкАт (натPly), МкАт (рекPly) и ПкАт (рекPly) нейтрализовали цитотоксическое действие натPly на эритроциты и клетки CHO-K1 в опытах *in vitro* и способствовали продлению жизни мышей, зараженных *S. pneumoniae* в опытах *in vivo*. Дальнейшие исследования в этом направлении целесообразно проводить при использовании МкАт (рекPly) с учетом их направленности к участкам молекулы Ply, ассоциированным с формированием протективного иммунного ответа.

В перспективе МкАт (Ply) можно рассматривать как инструмент, предназначенный для снижения патогенности пневмококка у пациентов с тяжелой формой пневмококковой инфекции методом пассивной иммунотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Marshall J.E., Faraj B.H.A., Gingras A.R. et al. The crystal structure of pneumolysin at 2.0Å resolution reveals the molecular packing of the pre-pore complex. *Sci Rep* 2015;5:13293. DOI: 10.1038/srep13293
- Lawrence S.L., Feil S.C., Morton C.J. et al. Crystal structure of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin provides key insights into early steps of pore formation. *Sci Rep* 2015;5:14352. DOI: 10.1038/srep14352
- Vögele M., Bhaskara R.M., Mulvihill E. et al. Membrane perforation by the pore-forming toxin pneumolysin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116(27):13352–7. DOI: 10.1073/pnas.1904304116
- Курбатова Е.А., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф. и др. Цитопатогенное действие нативного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* на клетки линии CHO-K1. *Российский биотерапевтический журнал* 2024;23(1):51–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2024-23-1-51-57. Kurbatova E.A., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F. et al. Cytopathogenic effect of *Streptococcus pneumoniae* native pneumolysin in CHO-K1 cells. *Rossiiskij bioterapevticheskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2024;23(1):51–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2024-23-1-51-57
- Ganpule S., Vijaya A.K., Sukova A., Preta G. Membrane cholesterol content and lipid organization influence melittin and pneumolysin pore-forming activity. *Toxins (Basel)* 2022;14(5):346. DOI: 10.3390/toxins14050346
- Kucinskaite-Kodze I., Simanavicius M., Dapkunas J. et al. Mapping of recognition sites of monoclonal antibodies responsible for the inhibition of pneumolysin functional activity. *Biomolecules* 2020;10(7):1009. DOI: 10.3390/biom10071009
- Del Mar García-Suárez M., Cima-Cabal M.D., Flórez N. et al. Protection against pneumococcal pneumonia in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin. *Infect Immun* 2004;72(8):4534–40. DOI: 10.1128/IAI.72.8.4534-4540.2004
- De Los Toyos J.R., Méndez F.J., Aparicio J.F. et al. Functional analysis of pneumolysin by use of monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1996;64(2):480–4. DOI: 10.1128/iai.64.2.480-484.1996
- Sephalika S., Mohakud N.K., Johargy A.K. et al. Development of an immunochromatographic test strip to detect pneumolysin by monoclonal antibody capture method. *Journal of King Saud University – Science* 2024;36(6):103213. DOI: 10.1016/j.jksus.2024.103213
- Cima-Cabal M.D., Méndez F.J., Vázquez F. et al. A specific and ultrasensitive chemiluminescent sandwich ELISA test for the detection and quantitation of pneumolysin. *J Immunoassay Immunochem* 2001;22(2):99–112. DOI: 10.1081/IAS-100103223
- Suárez-Álvarez B., García-Suárez Mdel M., Méndez F.J., de los Toyos J.R. Characterization of mouse monoclonal antibodies for pneumolysin: Fine epitope mapping and V gene usage. *Immunol Lett* 2003;88(3):227–39. DOI: 10.1016/s0165-2478(03)00081-6
- Jefferies J.M.C., Johnston C.H.G., Kirkham L.S. et al. Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. *J Infect Dis* 2007;196(6):936–44. DOI: 10.1086/520091
- Yakovleva I.V., Gavrilova N.F., Kurbatova E.A. et al. Immunochemical characteristics and functional activity of monoclonal antibodies obtained to the recombinant form of pneumolysin. *Bull Exp Biol Med* 2025;178(3):346–50. DOI: 10.1007/s10517-025-06334-w

14. Курбатова Е.А., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф. и др. Разработка тест-системы на основе иммуноферментного анализа для детекции рекомбинантного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):52–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-4-52-59
Kurbatova E.A., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F. et al. Development of the test system based on enzyme immunoassay for the detection of recombinant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(4):52–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-4-52-59
15. Vorobyev D.S., Sidorov A.V., Kaloshin A.A. et al. Preparation a recombinant form of pneumolysin protein from *Streptococcus pneumoniae*. Bull Exp Biol Med 2023;174(6):749–53. DOI: 10.1007/s10517-023-05785-3
16. Vorobyev D.S., Sidorov A.V., Ammour Y.I. et al. Analysis of toxicity of recombinant pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*. Bull Exp Biol Med 2024;177(1):137–9. DOI: 10.1007/s10517-024-06145-5
17. Broecker F., Anish C., Seeberger P.H. Generation of monoclonal antibodies against defined oligosaccharide antigens. Methods Mol Biol 2015;1331:57–80. DOI: 10.1007/978-1-4939-2874-3_5
18. Yu L., Zhu G., Zhang Z. et al. Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials. J Nanobiotechnol 2023;21(1):218. DOI: 10.1186/s12951-023-01969-1
19. Petukhova E.S., Vorobyev D.S., Sidorov A.V. et al. Immunization with recombinant pneumolysin Induces the production of antibodies and protects mice in a model of systemic Infection caused by *Streptococcus pneumoniae*. Bull Exp Biol Med 2020;68(4):485–7. DOI: 10.1007/s10517-020-04736-6

Вклад авторов

Е.А. Курбатова: анализ и обобщение результатов;
И.В. Яковлева: гибридизация и клонирование, исследование нейтрализующей активности антител;
Н.Ф. Гаврилова: получение моноклональных и поликлональных антител;
Д.С. Воробьев: получение рекомбинантного пневмолизина и поликлональной кроличьей сыворотки;
Е.С. Петухова: статистическая обработка данных;
И.Б. Семенова: анализ литературы по теме статьи;
А.Е. Зайцев: исследование гемолитической активности нативного пневмолизина;
Ю.В. Волох: иммунизация животных;
Н.О. Вартанова: культивирование штаммов микроорганизмов;
А.В. Поддубиков: получение ультразвукового дезинтеграта клеток пневмококка;
О.М. Афанасьева: пассивная защита мышей;
А.В. Зубков: оценка морфологии клеток.

Authors's contributions

E.A. Kurbatova: analysis of the data obtained and summarizing of results;
I.V. Yakovleva: hybridization, cloning and investigation of neutralizing antibody activity;
N.F. Gavrilova: obtaining of monoclonal and polyclonal antibodies;
D.S. Vorobyev: production of recombinant pneumolysin and polyclonal rabbit serum;
E.S. Petukhova: statistical analysis;
I.B. Semenova: review of publications on the topic of article;
A.E. Zaitsev: hemolytic activity study of native pneumolysin;
Yu.V. Volokh: animal immunization;
N.O. Vartanova: cultivation of microorganisms;
A.V. Poddubikov: obtaining ultrasonic disintegrate of pneumococcal cells;
O.M. Afanasyeva: passive protection of mice;
A.V. Zubkov: assessment of cell morphology.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Курбатова / E.A. Kurbatova: <https://orcid.org/0000-0002-0282-4471>
И.В. Яковлева / I.V. Yakovleva: <https://orcid.org/0000-0001-5123-2651>
Н.Ф. Гаврилова / N.F. Gavrilova: <https://orcid.org/0000-0001-6704-0339>
Д.С. Воробьев / D.S. Vorobyev: <https://orcid.org/0000-0002-1926-8803>
Е.С. Петухова / E.S. Petukhova: <https://orcid.org/0000-0003-0796-5764>
И.Б. Семенова / I.B. Semenova: <https://orcid.org/0000-0002-6630-4838>
А.Е. Зайцев / A.E. Zaitsev: <https://orcid.org/0000-0002-8434-231X>
Ю.В. Волох / Yu.V. Volokh: <https://orcid.org/0000-0002-5161-4964>
Н.О. Вартанова / N.O. Vartanova: <https://orcid.org/0000-0002-6372-9910>
А.В. Поддубиков / A.V. Poddubikov: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>
О.М. Афанасьева / O.M. Afanasyeva: <https://orcid.org/0000-0003-0875-4141>
А.В. Зубков / A.V. Zubkov: <https://orcid.org/0000-0002-0056-5082>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 19.02.2025. Принята к публикации: 11.07.2025. Опубликована онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 19.02.2025. Accepted for publication: 11.07.2025. Published online: 25.09.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-29-35>

Получение и характеристика моноклональных антител к ферропортину человека

М.Г. Хотулева¹, Я.О. Садовская¹, А.О. Каримова^{1,2}, Н.Е. Варламов¹, Д.А. Хоченков¹, М.В. Миронова¹, Д.В. Гусев¹, О.Н. Солопова¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»; Россия, 101000 Москва, ул. Мясницкая, 20

Контакты: Маргарита Геннадьевна Хотулева khotulevamargarita@gmail.com

Введение. Ферроптоз – это тип неапоптотической железорависимой формы регулируемой гибели клеток. Единственным экспортером железа из клеток является ферропортин, однако его вовлечение в ферроптоз клеток малоизученно. Активация или блокировка путей ферроптоза может обеспечить терапевтическую стратегию при лечении ряда заболеваний. Контроль экспрессии ферропортина позволит подобрать более эффективную терапию опухоли. Получение моноклональных антител (МкАт) к ферропортину человека поможет при дальнейшем изучении его роли в ферроптозе опухолевых клеток.

Цель исследования – получение и характеристика МкАт к ферропортину человека.

Материалы и методы. Методом гибридомной технологии получены мышиные МкАт против синтетического пептида, соответствующего участку белка ферропортина. Пептид синтезировали методом твердофазного автоматического синтеза.

Результаты. Выбран и синтезирован 15-членный пептид с последовательностью ELKQLNLHKDTEPKP (ELK). Получены конъюгаты синтетического пептида с белками-носителями. Получено 4 стабильных гибридных клон, наработаны образцы МкАт. Образцы успешно протестированы с использованием методов проточной цитометрии, иммуноферментного анализа, электрофореза в полиакриламидном геле.

Заключение. Получены и охарактеризованы 4 антитела против ферропортина, связывающие пептид ELK. Антитела могут быть использованы в дальнейших исследованиях транспорта железа в опухолевых клетках.

Ключевые слова: ферропортин, моноклональное антитело, ферроптоз, транспорт железа, иммуноферментный анализ

Для цитирования: Хотулева М.Г., Садовская Я.О., Каримова А.О. и др. Получение и характеристика моноклональных антител к ферропортину человека. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):29–35.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-29-35>

Production and characterization of monoclonal antibodies to synthetic human ferroportin peptide

Margarita G. Khotuleva¹, Yana O. Sadovskaya¹, Anastasia O. Karimova^{1,2}, Nikolay E. Varlamov¹, Dmitry A. Khochenkov¹, Maria V. Mironova¹, Dmitriy V. Gusev¹, Olga N. Solopova¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²National Research University Higher School of Economics; 20 Myasnitskaya St., Moscow 101000, Russia

Contacts: Margarita Gennadiyevna Khotuleva khotulevamargarita@gmail.com

Background. Ferroptosis is a type of non-apoptotic iron-dependent form of regulated cell death. Ferroportin is the only exporter of iron from cells, however, the involvement of ferroportin in cell ferroptosis is poorly understood. Activation or blocking of ferroptosis pathways may provide a therapeutic strategy for the treatment of a number of diseases. Control of ferroportin expression will make it possible to select a more effective tumor therapy. Obtaining monoclonal antibodies to human ferroportin will help to further study its role in ferroptosis of tumor cells.

Aim. Obtaining and characterization of monoclonal antibodies to human ferroportin.

Materials and methods. Mouse monoclonal antibodies against a synthetic peptide corresponding to the ferroportin protein region were obtained using hybridomic technology. The peptide was synthesized by the method of solid-phase automatic synthesis.

Results. A 15-membered peptide with the sequence ELKQLNLHKDTEPKP (ELK) was selected and synthesized. Conjugates of the synthetic peptide with carrier proteins were obtained. 4 stable hybridomic clones were obtained, and samples of monoclonal antibodies were obtained. The samples were successfully tested using methods of flow cytometry, enzyme immunoassay, and polyacrylamide gel electrophoresis.

Conclusion. Four antibodies against ferroportin binding the ELK peptide were obtained and characterized. The antibodies can be used in further studies of iron transport in tumor cells.

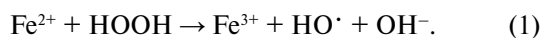
Keywords: ferroportin, monoclonal antibody, ferroptosis, iron transport, enzyme immunoassay

For citation: Khotuleva M.G., Sadovskaya Ya.O., Karimova A.O. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to synthetic human ferroportin peptide. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(3):29–35. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-29-35>

Введение

Одним из основных подходов к уничтожению опухолевых клеток является воздействие на них индукторами апоптоза, но их эффективность ограничена ввиду появления у опухоли резистентности к препаратам, что является серьезным препятствием в лечении рака [1, 2]. Исследования форм неапоптотической гибели клеток, напротив, открывают новые терапевтические пути для уничтожения раковых клеток и ограничения выживаемости клонов, устойчивых к лекарствам. Одной из таких форм является ферроптоз — неапоптотическая железозависимая регулируемая гибель клеток [3]. Ферроптоз как отдельный тип клеточной гибели утвержден в 2018 г. Номенклатурным комитетом клеточной гибели (Nomenclature Committee on Cell Death) [4]. При избытке железа в клетках происходит их гибель из-за накопления свободных радикалов, приводящего к окислению липидов митохондриальных мембран с их последующим разрывом. Небольшие пулы гемового железа могут напрямую катализировать образование свободных радикалов в ходе реакции Фентона (формула 1) и могут далее распространять перекисное окисление липидов [5]:



Высокий индекс пролиферации опухолевых клеток требует значительно большего расхода железа, так как оно входит в каталитический домен ДНК-полимеразы и необходимо для связывания этого фермента с ДНК [6].

Один из типов ферроптоза инициируется увеличением пулов железа, например из-за снижения экспрессии гена *SLC40A1*, кодирующего ферропортин, который является единственным известным транспортером железа из клетки [7, 8]. Ферропортин служит контрольной точкой для регулирования потоков железа из клетки. Как и другие белки метаболизма

железа, ферропортин также участвует в доступности железа для клетки и ферроптоза [9, 10]. Одно из направлений исследования биологической роли ферропортина — иммунохимические реакции с использованием моноклональных антител (МкАт). МкАт к ферропортину человека могут быть использованы для исследования роли ферропортина в метаболизме железа.

Цель исследования — получение и характеристика МкАт к ферропортину человека.

Материалы и методы

Синтез пептида

Аминокислотную последовательность человеческого ферропортина выбрали при помощи базы данных UniProt (Universal Protein Resource) [11]. Для получения пептида ELKQLNLHKDTEPKP (ELK) использовали твердофазный метод синтеза в автоматическом режиме. Синтез проводили с использованием автоматизированного пептидного синтезатора ResPep Sli (Intavis, Германия) согласно инструкции производителя.

Молекулярную массу и чистоту полученных пептидов подтверждали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС). Спектр ВЭЖХ-МС регистрировали на приборе Agilent Series 1100 LC/MSD Trap-SL (Agilent Technologies, США); колонка: ReproSil-Pur Basic-C18 4,6 × 250 мм, 5 мкм. Разделение осуществляли в градиентном режиме. Градиент: 0 мин — 95 % А, 20 мин — 100 % Б, где А — вода, Б — ацетонитрил. К смеси А и Б добавляли по 0,01 % трифторуксусной кислоты по объему. Детектирование осуществляли при длине волны 220 нм.

Получение конъюгатов синтетического пептида с белками-носителями

Белки — носители HSA (human serum albumin) и AFP (alpha-fetoprotein) и пептид ELK растворяли

в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), к смеси добавляли глутаровый альдегид до конечной концентрации 2 %. Инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Затем для нейтрализации глутарового альдегида добавляли раствор глицина до конечной концентрации 0,2 М и инкубировали 15 мин. Реакционную смесь диализовали против ФСБ. Таким образом получено 2 конъюгата с пептидом: ELK-HSA и ELK-AFP.

Получение моноклональных антител

Первичную иммунизацию мышей линии *Balb/c* проводили путем введения 100 мкг антигена (раствор конъюгатов ELK-HSA и ELK-AFP) с полным адъювантом Фрейнда (1:1) [10] в лапы. Бустирование антигеном неполным адъювантом Фрейнда проводили с интервалом 13 дней после первичной иммунизации. Гибридизацию иммунных лимфоцитов с клеточной линией Sp 2/0 делали на 4-й день после бустирования с помощью полиэтиленгликоля. На 4–6-е сутки после гибридизации наблюдали рост НАТ-устойчивых клонов. Проведено не менее 2 клонирований, в результате получено 4 стабильных клона. Скрининг специфичных клонов, способных к продуцированию антител, проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) [12].

Определение субизотипов антител в асцитных жидкостях

Субизотипирование проводили методом непрямого ИФА с помощью набора Mouse Typer Isotyping Panel (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя [13]. Антитела (в асците) тестировали на способность связываться с пептидом ELK методом непрямого ИФА.

Пептид ELK сорбировали на микротитрационный планшет высокой сорбции в концентрации 5 мкг/мл в ФСБ по 50 мкл в лунку в течение 1 ч при температуре 37 °С. На каждый клон 1 дорожка (8 лунок) планшета плюс 1 дополнительная дорожка на каждый антиген для отрицательного контроля ФСБ с добавлением альбумина и Твин-20. Разведенные асциты добавляли по 50 мкл в 6 лунок одного ряда на планшете. В 1-ю (А) и последнюю (Н) лунки добавляли ФСБ с альбумином и Твин-20 без антител для отрицательного контроля конъюгата. Антитела кролика, специфичные к каждому изотипу мышинных антител, разводили 1:3 в ФСБ с добавлением Твин-20 и в каждую добавляли по 50 мкл в 1 лунку дорожки с каждым клоном плюс 1 контрольная лунка для каждого антигена. Конъюгированный с пероксидазой хрена козий антикроличий иммуноглобулин (Ig) разводили 1/3000 в промывочном буфере ФСБ с добавлением Твин-20 и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре

FlexA-200HT (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., Китай), установив длину волны 450 нм.

Методом аффинной хроматографии выделяли антитела на сорбенте белок-G сефарозе и определяли их чистоту методом электрофореза в полиакриламидном геле [14].

Определение специфичности антител методом иммуноферментного анализа

Конъюгаты с пептидом ELK адсорбировали на поверхности лунок 96-луночного планшета в концентрации 5 мкг/мл в течение ночи при температуре 4 °С. Далее планшеты инкубировали со МкАт. В последнюю (Н) лунку добавляли ФСБ с добавлением альбумина и Твин-20 без антител для отрицательного контроля конъюгата. После проводили инкубацию со вторичными антителами 1:60 000 в течение 1 ч при температуре 37 °С. Далее в каждую лунку добавляли 100 мкл ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина) и инкубировали до развития окраски в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 10 % раствора серной кислоты. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре FlexA-200HT, установив длину волны 450 нм.

Проточная цитометрия

Определение связывания образцов выделенных антител к ферропортину (SLC40A1) проводили с использованием клеточной линии HT-29 (рака толстой кишки) с высокой экспрессией гена ферропортина и линии NCI-H1395 (рака легкого) с низкой экспрессией гена ферропортина. Клетки снимали с поверхности культуральных флаконов, отмывали центрифугированием и распределяли по 5×10^4 клеток в пробирки для проточной цитометрии. К клеточной суспензии добавляли исследуемые образцы в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки промывали буфером флуоресцентной активации сортировки клеток (fluorescence-activated cell sorting – FACS: PBS, 0,2 % (w/v) BSA, 10 mM NaN_3) и вносили по 5 мкл вторичных козьих антител к Ig мыши, конъюгированных с Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США), инкубировали на льду 30 мин. Клетки промывали FACS-буфером и определяли количество окрашенных клеток на проточном цитометре NovoCyte 2000R (Agilent Technologies, США) с программным обеспечением ACEA NovoFlow 1.3 (ACEA Bioscience, Бельгия).

Результаты

Синтез пептида

С использованием автоматизированного пептидного синтезатора ResPep Sli было получено 9,8 мг пептида с последовательностью ELKQLNLHKDTEPKP. По данным ВЭЖХ-МС для ELKQLNLHKDTEPKP:

время удерживания 6,8 мин, М 1789, содержание пептида составляет 92,3 %. Основной пик спектра приходится на расчетную молекулярную массу 1790 Да. Брутто-формула: $C_{79}H_{132}N_{22}O_{25}$.

Определение субизотипа антител против пептида ELK

Результаты определения субизотипов антител IgG против пептида ELK представлены следующим образом.

ELK A12 – IgG1;

ELK D1 – IgG1;

ELK C2 – IgG2a;

ELK H9 – IgG3.

Определение специфичности антител методом иммуноферментного анализа

Связывание МкАт с пептидом определяли по характеру кривой зависимости оптической плотности от концентрации антител в сравнении с контрольными образцами. Все полученные антитела способны аффинно связываться с неконъюгированным пептидом. Оба конъюгата не реагируют с белками HSA и AFP. С конъюгатом ELK-AFP аффинное связывание антител происходит лучше, чем с конъюгатом ELK-HSA, несмотря на то что все образцы, кроме антитела ELK C2, получены в результате иммунизации конъюгатом ELK-HSA (рис. 1, 2).

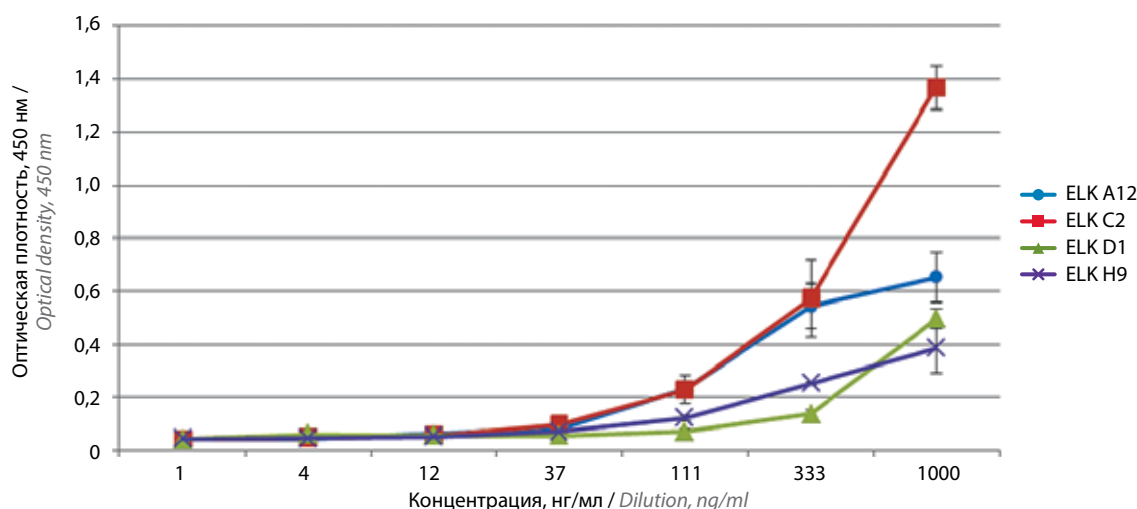


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от концентрации полученных антител на конъюгате ELK-AFP ($N = 3$). Здесь и далее на рис. 2: данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего

Fig. 1. The optical density of the obtained antibodies on the ELK-AFP conjugate ($N = 3$). Here and below in Fig. 2: the data are presented as mean value and standard error of the mean

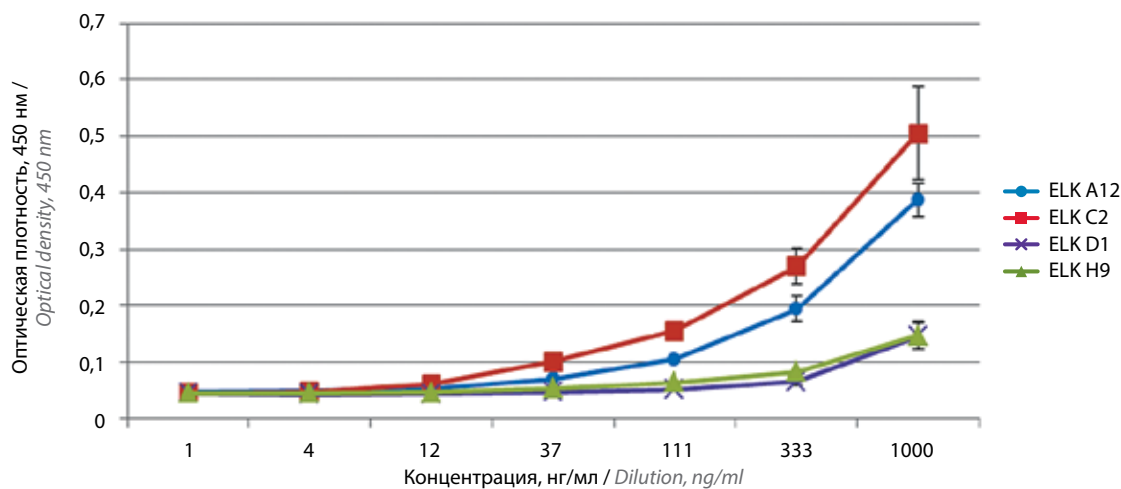


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от концентрации полученных антител на конъюгате ELK-HSA, $N = 3$

Fig. 2. The optical density of the obtained antibodies on the ELK-HSA conjugate, $N = 3$

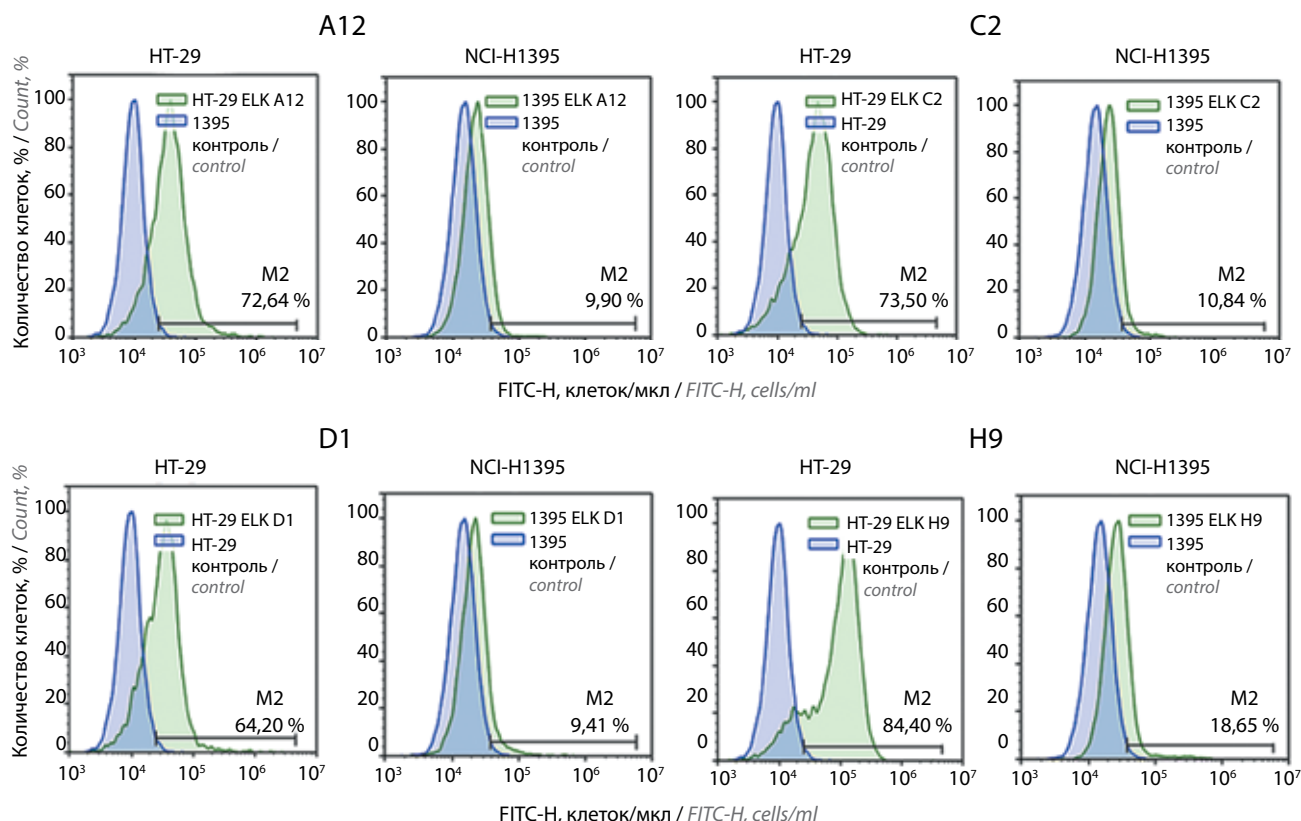


Рис. 3. Оценка связывания антител против пептида ELK со специфическим антигеном методом проточной цитометрии на клетках линии HT-29 и NCI-H1395 (контроль). FITC-H – флуоресцеин изотиоцианат; M2 – выделенная область, соответствующая FITC-позитивным клеткам, %

Fig. 3. Binding of antibodies to ELK peptide to a specific antigen by flow cytometry on the HT-29 cell line and NCI-H1395 (control). FITC-H – fluorescein isothiocyanate; M2 – the gated region corresponding to FITC-positive cells, %

Таблица 1. Связывание антител (%) против пептида ELK с клеточным ферропортином на линиях HT-29 и NCI-H1395 методом проточной цитометрии

Table 1. Binding of antibodies (%) to ELK-peptide to cellular ferroportin on the HT-29 and NCI-H1395 cell line by flow cytometry

Клеточная линия Cell line	Моноклональное антитело ELK ELK monoclonal antibody			
	A12	D1	C2	H9
HT-29	72,64	64,2	73,5	84,4
NCI-H1395	9,9	9,41	10,84	18,65

Определение связывания антител

с ферропортином методом проточной цитометрии

Наибольшую активность на клеточной линии HT-29 показали антитела к ферропортину клона ELK H9 – количество окрашенных клеток составило

84,4 %, однако все полученные антитела показали сравнимую активность. При этом у антител отсутствует неспецифическое связывание в аналогичном эксперименте на клеточной линии NCI-H1395 с низкой экспрессией гена ферропортина (табл. 1). Результаты представлены на рис. 3.

Закключение

В ходе исследования получены МкАт против 15-членного пептида ELK, соответствующего участку белка ферропортина. Продемонстрирована способность антител к аффинному связыванию с рекомбинантным ферропортином и поверхностным белком клеток, экспрессирующих ферропортин. Изучение механизма ферроптоза с использованием МкАт к ферропортину человека имеет большое значение для изучения механизмов ферроптоза. Настоящее исследование может инициировать дополнительные исследования по экспрессии ферропортина и его роли в ферроптозе опухолевых клеток.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D., Johnston P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013;13(10):714–26. DOI: 10.1038/nrc3599
- Okada H., Mak T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4(8):592–603. DOI: 10.1038/nrc1412
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018;25(3):486–541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
- Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 2009;46(5):531–42. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008
- Lisova A.E., Baranovskiy A.G., Morstadt L.M. et al. The iron-sulfur cluster is essential for DNA binding by human DNA polymerase ϵ . *Sci Rep* 2022;12(1):17436. DOI: 10.1038/s41598-022-21550-4
- Hassannia B., Wiernicki B., Ingold I. et al. Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma. *J Clin Invest* 2018;128(8):3341–55. DOI: 10.1172/JCI99032
- Li J., Cao F., Yin H.L. et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020;11(2):88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2
- Hassannia B., Vandenabeele P., Vanden Berghe T. Targeting ferroptosis to iron out cancer. *Cancer Cell* 2019;35(6):830–49. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.04.002
- Вартанян А.А. Метаболизм железа, ферроптоз, рак. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):14–20. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20
- Vartanian A.A. Iron metabolism, ferroptosis and cancer. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(3):14–20. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20
- Uniprot. URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9NP59/entry>.
- Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(5517):495–7. DOI: 10.1038/256495a0
- Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8(9):871–4. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-x
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0

Вклад авторов

М.Г. Хотулева: предоставление материалов исследования, получение, обработка, анализ, интерпретация данных, написание текста рукописи;

Я.О. Садовская, А.О. Каримова: предоставление материалов исследования, обработка, анализ, интерпретация данных, редактирование текста рукописи;

Н.Е. Варламов, Д.А. Хоченков, Д.В. Гусев: предоставление материалов исследования, обработка, анализ, интерпретация данных;

М.В. Миронова: предоставление материалов исследования;

О.Н. Солопова: разработка концепции и дизайна исследования, проведение исследования, редактирование текста рукописи.

Author's contributions

M.G. Khotuleva: research materials provision, acquisition, processing, analysis and interpretation of data, original draft preparation;

Ya.O. Sadovskaya, A.O. Karimova: research materials provision, acquisition, processing, analysis and interpretation of data, review and editing;

N.E. Varlamov, D.A. Khochenkov, D.V. Gusev: research materials provision, acquisition, processing, analysis and interpretation of data;

M.V. Mironova: research materials provision;

O.N. Solopova: study concept and design development, conducting research, review and editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.Г. Хотулева / M.G. Khotuleva: <https://orcid.org/0009-0008-6104-5233>

Я.О. Садовская / Ya.O. Sadovskaya: <https://orcid.org/0009-0009-7115-7797>

А.О. Каримова / A.O. Karimova: <https://orcid.org/0009-0000-0317-9948>

Н.Е. Варламов / N.E. Varlamov: <https://orcid.org/0000-0002-8602-6599>

Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

М.В. Миронова / M.V. Mironova: <https://orcid.org/0000-0002-6598-873X>

Д.В. Гусев / D.V. Gusev: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8265>

О.Н. Солопова / O.N. Solopova: <https://orcid.org/0000-0002-5465-6094>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 гг., соглашение № 075-15-2025-493 от 30.05.2025).

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (the Federal Scientific-Technical Programme for Genetic Technologies Development for 2019–2030, Agreement No. 075-15-2025-493 dated 30.05.2025).

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протоколы опытов были утверждены на заседании локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина».

Statement of the welfare of animals. The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes. The protocols of the experiments were approved at a meeting of the local Ethical Committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.

Статья поступила: 09.06.2025. Принята к публикации: 02.07.2025. Опубликовано онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 09.06.2025. Accepted for publication: 02.07.2025. Published online: 25.09.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-36-44>

Модификация красного флуоресцентного белка TagRFP для уменьшения его иммуногенности при создании флуоресцирующих модельных опухолей иммунокомпетентных мышей *Balb/c*

Н.К. Марынич, А.В. Гавшина, И.Г. Меерович

Институт биохимии им. А.Н. Баха ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»; Россия, 119071 Москва, Ленинский пр-кт, 33, стр. 2

Контакты: Ирина Геннадьевна Меерович imeerovich@inbi.ras.ru

Введение. Длинноволновые флуоресцентные белки наиболее перспективны при исследованиях *in vivo* на флуоресцирующих моделях опухолей лабораторных животных. Если экспрессирующие флуоресцентные белки опухоли имеют большую иммуногенность для данной линии иммунокомпетентных мышей по сравнению с исходными, то сложно вычленим иммунную составляющую противоопухолевого действия цитотоксической терапии.

Цель исследования – получение мышиных опухолевых клеточных линий 4T1, стабильно экспрессирующих исходный красный флуоресцентный белок TagRFP и мутантный белок TagRFP-L228A, получение опухолевых моделей на их основе и оценка гуморального иммунного ответа мышей линии *Balb/c* на такие опухоли.

Материалы и методы. Эукариотические плазмиды pcDNA3, содержащие гены, кодирующие экспрессию исходного белка TagRFP (TagRFP-WT) и белка с мутацией L228A (TagRFP-L228A), получали из прокариотических плазмид генно-инженерными методами. Индивидуальные клоны опухолевых клеток 4T1, экспрессирующие TagRFP-WT и TagRFP-L228A, получали путем последовательной липосомальной трансфекции клеток эукариотическими плазмидами, селекции и клонирования. Опухолевые модели получали подкожной инокуляцией суспензии клеток 4T1, 4T1-TagRFP-WT и 4T1-TagRFP-L228A самкам мышей *Balb/c*. Через 4 нед оценивали иммунный ответ на белок TagRFP методом иммуноферментного анализа по связыванию сывороток венозной крови мышей с исходным белком TagRFP-WT.

Результаты. Получены плазмиды для экспрессии белков TagRFP-WT и TagRFP-L228A в эукариотических клетках и клоны клеток 4T1, стабильно экспрессирующие эти белки. После инокуляции клеток 4T1-TagRFP-WT, 4T1-TagRFP-L228A и 4T1 опухоли развились у всех мышей соответствующих групп. Методом иммуноферментного анализа на планшетах с адсорбированным белком TagRFP-WT показано наличие у мышей *Balb/c* с флуоресцирующими опухолями гуморального иммунного ответа на исходный флуоресцентный белок в отличие от такового у мышей с опухолями 4T1. По сравнению с сыворотками мышей с опухолью 4T1-TagRFP-WT связывание с исходным белком TagRFP-WT сывороток мышей с опухолями 4T1-TagRFP-L228A уменьшается более чем в 4 раза.

Заключение. Единственная аминокислотная замена L228A в белке TagRFP приводит к существенному уменьшению гуморального иммунного ответа на экспрессируемый опухолями белок TagRFP-L228A по сравнению с исходным TagRFP-WT. Это позволит использовать экспрессирующие TagRFP-L228A клеточные линии для создания оптимизированных опухолевых моделей для мышей *Balb/c*.

Ключевые слова: красный флуоресцентный белок TagRFP, иммуногенность, опухолевая модель, гуморальный иммунный ответ, иммуноферментный анализ

Для цитирования: Марынич Н.К., Гавшина А.В., Меерович И.Г. Модификация красного флуоресцентного белка TagRFP для уменьшения его иммуногенности при создании флуоресцирующих модельных опухолей иммунокомпетентных мышей *Balb/c*. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):36–44.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-36-44>

Modification of the red fluorescent protein TagRFP to reduce its immunogenicity in establishing fluorescent model tumors in immunocompetent *Balb/C* mice

Nadezhda K. Marynich, Alexandra V. Gavshina, Irina G. Meerovich

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences; 33, bld. 2 Leninsky Prospekt, Moscow 119071, Russia

Contacts: Irina Gennad'evna Meerovich imeerovich@inbi.ras.ru

Background. Long-wave fluorescent proteins (FP) exhibit significant potential for *in vivo* investigations involving fluorescent tumor models in laboratory animals. If tumors expressing FP exhibit enhanced immunogenicity in a specific strain of immunocompetent mice as compared with the original tumors, it becomes challenging to delineate the immune component contributing to the antitumor effects of cytotoxic therapy.

Aim. To establish mouse tumor cell lines 4T1 that consistently express the original protein TagRFP and the mutant protein TagRFP-L228A, to develop tumor models based on these cell lines, and to assess the humoral immune response of *Balb/c* mice to such tumors.

Materials and methods. Eukaryotic plasmids pcDNA3 containing genes encoding the expression of the original protein TagRFP (TagRFP-WT) and the L228A mutant protein (TagRFP-L228A) were obtained from prokaryotic plasmids by genetic engineering methods. Individual 4T1 tumor cell clones expressing TagRFP-WT and TagRFP-L228A were obtained by sequential liposomal transfection of cells with eukaryotic plasmids, selection, and cloning. Tumor models were obtained by subcutaneous inoculation of suspensions of 4T1, 4T1-TagRFP-WT, and 4T1-TagRFP-L228A cells into female *Balb/c* mice. After 4 weeks, the immune response to TagRFP protein was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by binding of mouse venous blood sera to the parent TagRFP-WT protein.

Results. Plasmids for the expression of TagRFP-WT and TagRFP-L228A proteins in eukaryotic cells and 4T1 cell clones stably expressing these proteins have been obtained. After inoculation of 4T1-TagRFP-WT, 4T1-TagRFP-L228A and 4T1 cells, tumors developed in all mice of the corresponding groups. Using an ELISA on microplates with adsorbed TagRFP-WT protein, the presence of a humoral immune response to the original fluorescent protein was shown in *Balb/c* mice with fluorescent tumors, in contrast to mice with 4T1 tumors. Compared to the sera of mice with the 4T1-TagRFP-WT tumors, the binding to the original protein TagRFP-WT of the sera of mice with the 4T1-TagRFP-L228A tumors decreases by more than 4 times.

Conclusion. The single amino acid substitution L228A in the TagRFP protein leads to a significant reduction in the humoral immune response to the TagRFP-L228A protein expressed by tumors compared to the original TagRFP-WT. This will allow using TagRFP-L228A expressing cell lines to create optimized tumor models for *Balb/c* mice.

Keywords: red fluorescent protein TagRFP, immunogenicity, tumor model, humoral immune response, enzyme-linked immunosorbent assay

For citation: Marynich N.K., Gavshina A.V., Meerovich I.G. Modification of the red fluorescent protein TagRFP to reduce its immunogenicity in establishing fluorescent model tumors in immunocompetent *Balb/C* mice. *Rossijskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(3):36–44. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-36-44>

Введение

Флуоресцентные белки (ФБ) используются в качестве генетически кодируемых флуоресцентных маркеров для визуализации биологических процессов, происходящих в живых клетках, тканях и организмах. Длинноволновые (красные и дальне-красные) флуоресцентные белки [1] наиболее перспективны при исследованиях *in vivo* на лабораторных животных [2, 3]. Использование таких ФБ предоставляет возможность изучения опухолевых узлов в удаленных от поверхности тела лабораторных животных органах и тканях благодаря большому пропусканию света тканями животных в этом диапазоне спектра за счет низкого поглощения и рассеяния в нем. Это особенно важно при использовании флуоресцирующих моделей метастазирующих опухолей [4]. Красный флуоресцентный

белок TagRFP отличается высоким коэффициентом экстинкции и длительным временем жизни флуоресценции. Он широко используется в качестве генетически кодируемого сенсора как сам по себе, так и в составе более сложных генетически кодируемых сенсоров, например, для детекции каспаза-3-зависимого апоптоза в клетках флуоресцирующих опухолей [5].

В последние годы значительное внимание уделяется иммунной составляющей противоопухолевого эффекта, в том числе при изучении химиотерапии [6], фотодинамической терапии [7–9].

Исходно многие опухолевые модели на основе экспрессирующих ФБ опухолевых клеточных линий создавались преимущественно для иммунодефицитных мышей Nude или SCID [10]. Это давало

возможность использовать широкий спектр опухолевых моделей, включая те, которые основаны на клеточных линиях человеческих опухолей, но такой подход не рассматривал проблему влияния на результаты исследований иммунного ответа на экспрессирующийся в опухолевых клетках ФБ. При использовании в качестве опухолевых моделей ФБ-экспрессирующих опухолей сингенных иммунокомпетентных мышей оказалось, что многие ФБ иммуногенны для мышей-хозяев. В связи с этим, например, экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок GFP клеточную линию аденокарциномы толстой кишки мыши СТ-26 можно было использовать у иммунокомпетентных мышей (*Balb/c*) для изучения ранних стадий метастатического роста у мышей, в частности для отслеживания экстравазации опухолевых клеток. Однако оценку долгосрочного метастатического роста такой опухоли целесообразно проводить на иммунодефицитных мышах [11].

В исследовании [12] представлено, что экспрессия флуоресцентных белков GFP или TagRFP некоторыми модельными опухолями (например, после подкожной инокуляции соответствующих линий на основе клеток СТ-26) коррелирует с отторжением опухоли начиная с 8-го дня после инокуляции. При тех же условиях экспрессия этих белков опухолями 4T1 и B16-F10 не оказывала существенного влияния на развитие опухолей на основе 4T1 у мышей линий *Balb/c* и B16-F10 у мышей линии C57BL/6 (для B16-F10). Авторы связали это как со сравнительно более высоким уровнем экспрессии флуоресцентных белков клетками СТ-26, так и с имеющимися в литературе сведениями о сравнительно более высокой иммуногенности собственно опухолей СТ-26.

В исследовании [13] продемонстрировано, что скорость роста опухолей карциномы легких Льюис снижена после трансдукции tdTomato и люциферазы (tdTomato/Luc) по сравнению с исходной клеточной линией. Кроме того, экспрессия tdTomato/Luc опухолевыми клетками изменила микроокружение опухоли за счет увеличения лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, при одновременном ингибировании супрессорных клеток миелоидного происхождения, индуцированных опухолью. Таким образом, показано, что трансгенная экспрессия чужеродных белков может вызывать иммунные реакции в иммунокомпетентных сингенных моделях трансплантированных опухолей, что может оказывать влияние на оценку эффективности экспериментальных препаратов.

А. Castano и соавт. [14] показали, что стабильная экспрессия зеленого ФБ EGFP (enhanced green fluorescent protein) в опухолях мышей подавляла рост опухоли и приводила к образованию цитотоксических Т-клеток CD8 (cluster of differentiation 8), которые распознают EGFP-экспрессирующие клетки, а им-

плантация EGFP-экспрессирующих опухолей мышам вызывает присутствие анти-EGFP антител иммуноглобулина класса G в сыворотке крови. При оценке результатов фотодинамической терапии (ФДТ) установлено, что имеются значительные различия между ответом на мышинные опухоли, полученные из стабильно экспрессирующих EGFP и немодифицированных опухолевых клеток RIF-1. ФДТ с производным бензопорфирина приводила к 100 % излечению опухолей RIF-1, экспрессирующих EGFP, что значительно отличалось от результата воздействия на неэкспрессирующие ФБ опухоли RIF-1, где результат был менее значителен и продолжителен. После ФДТ также снижалась скорость роста флуоресцирующей опухоли по сравнению с нефлуоресцирующей, и было высказано предположение о том, что так проявляется реакция иммунной системы мыши на присутствие «чужеродного» белка EGFP после цитотоксической терапии.

Таким образом, при выраженной иммунной составляющей противоопухолевого эффекта использование ФБ в качестве маркера опухолевых клеток в экспериментальной терапии опухолей ставит вопрос о достоверной интерпретации результатов. В том случае, когда экспрессирующие ФБ опухоли имеют большую иммуногенность для данной линии иммунокомпетентных мышей по сравнению с исходными опухолями, более сложно вычлнить иммунную составляющую противоопухолевого действия цитотоксической терапии (например, химиотерапии или ФДТ) и сопоставить результаты, полученные на исходной (нефлуоресцирующей) и флуоресцирующей моделях. Экспрессируемый опухолевыми клетками ФБ может действовать как характерный для них дополнительный чужеродный антиген, влияя как на прививаемость и скорость роста опухоли, так и на дальнейшую реакцию иммунной системы на повторную перевивку опухоли после терапевтического воздействия, а также на достоверность оценки терапевтического воздействия на опухоль.

В связи с этим встает задача снижения иммуногенности ФБ, причем ее нужно решать в рамках конкретной модели на животных, поскольку один и тот же ФБ для одной линии иммунокомпетентных мышей может быть существенно иммуногенным, а для другой – нет [15]. Один из подходов к снижению иммуногенности флуоресцентных белков как генетически кодируемых сенсоров состоит во внесении соответствующих мутаций непосредственно в последовательность белка. Такой подход, в частности, рассматривается в работе [16], в которой получены мутанты EGFP, демонстрирующие сниженную иммуногенность белка по сравнению с немодифицированным белком (обозначаемым в литературе как WT – wild type, т. е. дикого типа) при экспрессии

в опухолевых клетках, служащих для создания опухолевой модели у мышей линии *Balb/c* либо C57BL/6. Например, полученный мутант EGFP Y200T оказался практически идентичным исходному EGFP по физико-химическим свойствам. При этом экспериментальные данные подтвердили, что гуморальный иммунный ответ на вариант EGFP Y200T у мышей линии *Balb/c* практически отсутствует.

Ранее мы использовали искусственную нейросеть для предсказания наличия эпитопов главного комплекса гистосовместимости I класса NetMHC-4.0 [17] в аминокислотной последовательности красного флуоресцентного белка TagRFP (рис. 1) для мышей линии *Balb/c*. По результатам этого поиска и в согласовании с расположением В-клеточных эпитопов, определенных с помощью ресурсов Ellipro [18] и DiscoTope 3.0 [19], для мышей линии *Balb/c* нами были выбраны возможные места одиночных мутаций для уменьшения связывания белка с соответствующими эпитопами.

Для двукратной иммунизации мышей линии *Balb/c* использован мутантный белок TagRFP-L228A, полученный в результате сайт-направленного мутагенеза в положении на С-конце TagRFP за пределами β -бочонка и не отличавшийся от белка TagRFP-WT по спектральным свойствам. С использованием иммуноферментного анализа (ИФА) сывороток крови мышей показано, что замена L228A привела к уменьшению связывания мышинных сывороток с адсорбированным белком дикого типа по сравнению с иммунизацией исходным белком [20].

Цель данной работы — получение мышинных опухолевых клеточных линий 4T1, стабильно экспрессирующих исходный красный ФБ TagRFP и мутантный белок TagRFP-L228A, получение опухолевых моделей на их основе и оценка гуморального иммунного ответа мышей линии *Balb/c* на такие опухоли.

MVSKGGELIKENMHMKLYMEGTVNNHNFKCTSEGEGKPYEGTQ
 TMRIKVVEGGPLPFAFDILATSFMYGSRTFINHTQGIPDFKQSF
 PEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLDGCLINVKIRGVNFPNSNG
 PVMQKKTGLWEANTEMLYPADGGLEGRSDMALKLVGGGH
 LICNFKTTYRSKKPAKLNKMPGVVYVD
 HRLRIKEADKETVVEQHEVAVARYCDLPSKLGHK

Рис. 1. Первичная последовательность исходного красного флуоресцентного белка TagRFP, использованного в работе. Голубым выделена последовательность, входящая в предсказанные эпитопы, внутри которых производились замены при получении мутанта. Подчеркнуто место введения мутации Leu->Ala

Fig. 1. Primary sequence of TagRFP used in the work. The sequence included in the predicted epitopes, within which substitutions were made performed at obtaining the mutant, is highlighted in blue. The site of introduction of the Leu->Ala mutation is underlined

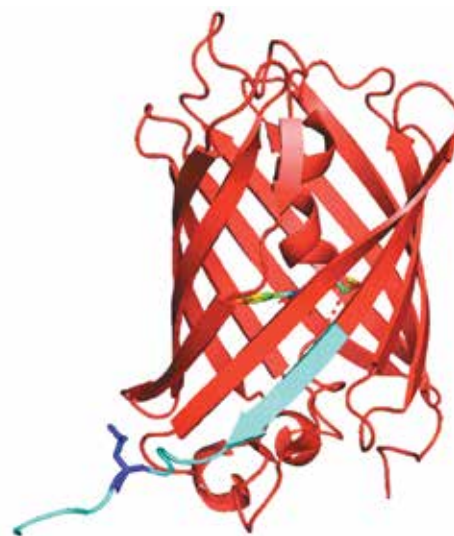


Рис. 2. Модель третичной структуры белка TagRFP. Голубым цветом выделены эпитопы, внутри которых производилась мутация, фиолетовым — аминокислотный остаток лейцина, который заменяли на аланин в мутанте TagRFP-L228A. Модель создана при помощи ресурса PyMOL v.2.2.0

Fig. 2. Model of the tertiary structure of the TagRFP. Epitopes within which the mutation was performed are highlighted in blue, the leucine amino acid residue which was replaced by alanine in the TagRFP-L228A mutant, is highlighted in purple. The model was created using the PyMOL v.2.2.0 software

Материалы и методы

Животные

Мыши линии *Balb/c* (самки возрастом 6–8 нед) категории SPF получены из Пущинского питомника лабораторных животных. Животных содержали в специальном помещении по 3 особи в клетках с фильтрами в защищенном шкафу Sync 4E4 (Charles River, Франция) с позитивным давлением, влажностью 30–50 %, температурой 22–26 °C, соблюдением режима «день/ночь» и свободным доступом к еде и воде.

Опухолевая клеточная линия и ее культивирование

Культуру клеток рака молочной железы мышей 4T1 (ATCC №CRL-2539) культивировали в полной питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, «ПанЭко», Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % фетальной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия, происхождение сыворотки — Южная Америка), 1 % L-глутамина («ПанЭко», Россия), 1 % пенициллин-стрептомицина («ПанЭко», Россия), во влажной атмосфере при температуре 37 °C с 5 % CO₂.

Конструирование эукариотической плазмиды

Для экспрессии в клетках эукариот последовательности исходного белка TagRFP, а также его мутанта TagRFP-L228A клонированы в вектор pcDNA3 по сайтам HindIII/XhoI путем получения методом

полимеразной цепной реакции фрагментов (в качестве матрицы использованы исходные гены в векторе прокариотической плазмиды pET22b) с праймерами (табл. 1), рестрикции их и вектора (HindIII компании SibEnzyme, Россия, XhoI Thermo Fisher Scientific, США) и последующего лигирования Т4 ДНК-лигазой (Thermo Fisher Scientific, США). Рестрикция и лигирование выполнены согласно протоколам производителя. Отсутствие случайных и наличие целевых замен подтверждено секвенированием («Евроген», Россия).

Таблица 1. Праймеры для составления конструкций для экспрессии TagRFP и TagRFP-L228A в эукариотических клетках

Table 1. Primers for constructing expression constructs for TagRFP and TagRFP-L228A in eukaryotic cells

Праймер Primer	Последовательность Sequence
TagRFP_fw_ HindIII_K	TTT AAG CTT GCC ACC ATG GTG TCT AAG GGC G
TagRFP_rev_ Xho	TTA TCT CGA GTT ATT TGT GCC CCA GTT
TRFP228_rev_ Xho	TTA TCT CGA GTT ATT TGT GCC CGG CTT

Плазмиды pcDNA3, содержащие гены, кодирующие экспрессию TagRFP-WT и TagRFP-L228A, нарабатывали в клетках *Escherichia coli* DH5a, выделяли и очищали с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя, включая очистку плазмидной ДНК от эндотоксинов с использованием входящего в набор раствора.

Липосомальная трансфекция клеток 4Т1

Клетки 4Т1 высевали в лунки 24-луночных культуральных планшетов в полной культуральной среде в количестве, достаточном для получения через 1 сут монослоя 70–80 % конfluентности. Трансфекцию проводили с использованием реагента для липосомальной трансфекции GenJect-39 (Molekta, Россия) согласно инструкции производителя, варьируя нагрузку клеток по реагенту для липофекции, соотношение плазмидной ДНК и реагента и время инкубации (3–18 ч). Затем среду меняли на свежую полную среду для культивирования.

Получение клонов клеток 4Т1, экспрессирующих красный флуоресцентный белок TagRFP и его мутант

Спустя 1 сут после замены среды в нее добавляли селективирующий антибиотик генетицин (G-418) (NeoFroxx GmbH, Германия) сначала в концентрации 200 мкг/мл среды, а затем постепенно эскалировали

дозу до 1200 мкг/мл среды, повышая концентрацию на 200 мкг/мл каждые 3–4 дня. Полученную смесь флуоресцирующих клеток рассаживали методом предельного разведения [21] в лунки 96-луночного культурального планшета из расчета 1–2 клетки на лунку в полной ростовой среде, а затем вели мониторинг роста флуоресцирующих одиночных клонов, пересаживая их в лунки планшетов большего размера. Затем клоны нарабатывали и культивировали в полной ростовой среде в течение нескольких пассажей, проводя мониторинг стабильности флуоресценции целевых белков.

Инокуляция опухолевых клеток 4Т1, экспрессирующих красный флуоресцентный белок TagRFP и его мутанты, мышам *Balb/c*

Клетки исходной клеточной линии 4Т1, а также клонов 4Т1, экспрессировавших исходный белок TagRFP-WT и его мутант TagRFP-L228A, наращивали в культуральных флаконах площадью 75 см² (SPL, Корея), затем трипсинизировали 0,25 % раствором Трипсин-ЭДТА («ПанЭко», Россия) с последующим центрифугированием и трехкратной отмывкой фосфатно-солевым стерильным буфером (PBS) Дульбекко («ПанЭко», Россия), ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе («ПанЭко», Россия) исходя из концентрации 1,5 млн клеток/100 мкл и хранили на льду до инокуляции мышам (в течение не более получаса).

Инокуляцию опухолевых клеток проводили в правый бок самкам мышей линии *Balb/c* (возрастом 10–12 нед) по 100 мкл клеточной суспензии на особь. Клетки каждой клеточной линии вводили группе из 3 мышей.

Подготовка планшетов для иммуноферментного анализа

В лунки планшета для ИФА («НИИмедполимер», Россия) добавляли по 50 мкл очищенного нативного исходного белка TagRFP в концентрации 50 мкг/мл в 0,1 М карбонатном буфере, pH 8,7, инкубировали 2 ч при температуре 37 °С, а затем ночь при температуре 4 °С. Далее отмывали лунки восьмикратно буфером PBST (PBS с Твин-20): PBS, pH 7,4, 0,05 % Твин-20 («Диаэм», Россия). Затем в течение 2 ч инкубировали планшет с 200 мкл/лунку раствором PBS-AT (PBST + 1 % BSA (Elabscience, КНР)), также восьмикратно отмывали.

Оценка гуморального иммунного ответа на красные флуоресцентные белки, экспрессируемые опухолями

Через 4 нед после инокуляции опухолей отбирали по 10 мкл крови из хвостовой вены мышей в 100 мкл физиологического раствора, отстаивали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем в течение ночи при температуре 4 °С. После этого образцы центрифугировали

при температуре 4 °С, сыворотку отбирали и использовали для оценки связывания с исходным белком TagRFP, адсорбированным в лунках планшетов для ИФА. Сыворотку разводили буфером PBSAT (PBS + 0,05 % Твин-20 + 1 % BSA) и раститровывали в 3 раза в лунках ранее подготовленного 96-луночного иммунологического планшета с адсорбированным TagRFP (2 повтора на каждую сыворотку). После инкубации (1 ч при температуре 37 °С) проводили восьмикратную отмывку буфером PBST (PBS + 0,05 % Твин-20). В качестве вторичных антител использовали антитела козы к иммуноглобулинам класса G мыши, меченные пероксидазой хрена (Elabsience, КНР). В лунки добавляли по 100 мкл раствора вторичных антител в PBSAT, инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С, затем отмывали 8 раз буфером PBST. В каждую лунку добавляли по 100 мкл готового раствора, содержащего субстрат пероксидазы ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина) и пероксид водорода («НВО Иммуно-тех», Россия). Через 15 мин добавляли стоп-раствор (1 М раствор серной кислоты) по 50 мкл на лунку, при этом растворы в лунках меняли цвет с синего на желтый. Измеряли оптическую плотность растворов в лунках на длине волны 450 нм, используя мультимодальный планшетный спектрофотометр CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Германия).

Результаты и обсуждение

Свойства клонов клеток, экспрессирующих исходный белок TagRFP и его мутанты

После трансфекции опухолевых клеток 4T1 плазмидами, кодирующими экспрессию флуоресцентного белка TagRFP-WT и его мутанта TagRFP-L228A, не обнаружено существенных отличий в эффектив-

ности, которая составляла приблизительно 10–15 %. Не отмечено токсичности трансфекции для клеток, которая могла бы проявляться в существенной гибели клеток или изменении морфологии флуоресцирующих клеток по сравнению с исходными.

Клоны имели сходную интенсивность флуоресценции (рис. 3).

Для полученных клонов флуоресцирующих клеток TagRFP-WT и TagRFP-L228A не наблюдали признаков токсичности, вызванных экспрессией белков опухолевыми клетками 4T1, как морфологически (отсутствие значимой доли флуоресцирующих клеток с измененной морфологией, а также погибших клеток), так и по скорости роста клеток флуоресцирующих клонов по сравнению друг с другом и с клетками исходной линии 4T1.

Получение опухолей 4T1, экспрессирующих исходный белок TagRFP и его мутант, и оценка гуморального ответа на экспрессируемые ими флуоресцентные белки

После перевивки опухоли развились у всех мышей, использованных в эксперименте. При оценке методом ИФА сыворотки мышей с различными опухолями (4T1, 4T1-TagRFP, 4T1-TagRFP-L228A) на планшетах с адсорбированным белком TagRFP-WT показано, что все мыши с опухолями, экспрессирующими красный ФБ, развили гуморальный иммунный ответ на исходный белок TagRFP (рис. 4).

Среднее значение разведения по группе мышей с соответствующими опухолями, при котором связывание сыворотки составляло 1/2 от «насыщающего» значения, у мышей с опухолями, экспрессирующими мутантный белок TagRFP-L228A, уменьшилось более

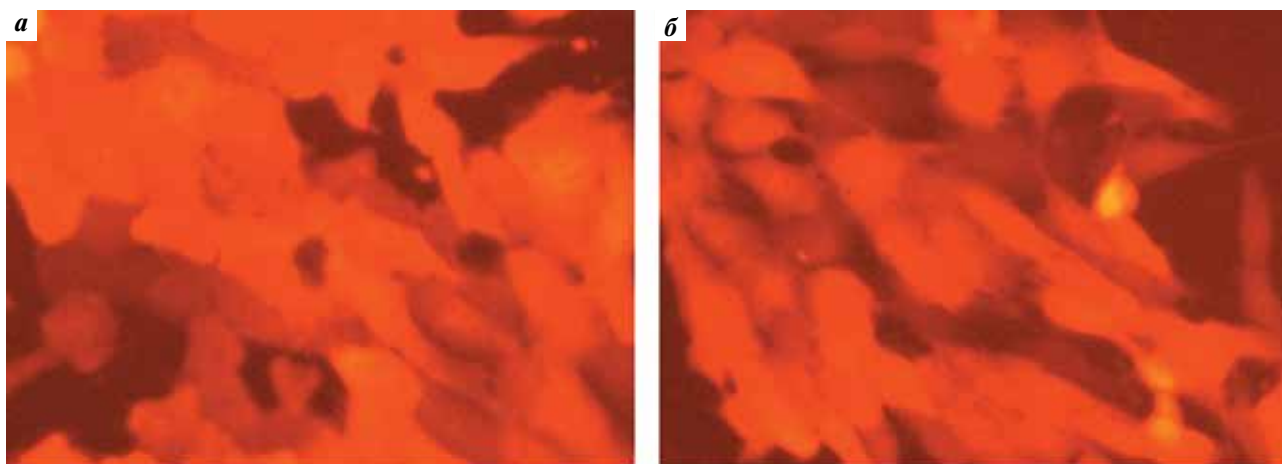


Рис. 3. Флуоресцентные микрофотографии клонов опухолевых клеток 4T1, экспрессирующих красные флуоресцентные белки. Флуоресцентный инвертированный микроскоп Nikon TE2000-U, $\times 40$. Вычисленная с использованием ПО ImageJ (НИН, США) средняя интенсивность флуоресценции для клеток TagRFP-WT (а) составила $77,98 \pm 20,38$ усл. ед., а для клеток TagRFP-L228A (б) — $69,42 \pm 17,93$ усл. ед.

Fig. 3. Fluorescent microphotographs of 4T1 tumor cell clones expressing red fluorescent proteins. Nikon TE2000-U fluorescence inverted microscope, $\times 40$. The average fluorescence intensity calculated using ImageJ software (NIH, USA) for TagRFP-WT cells (a) — 77.98 ± 20.38 a. u., and for TagRFP-L228A cells (b) — 69.42 ± 17.93 a. u.

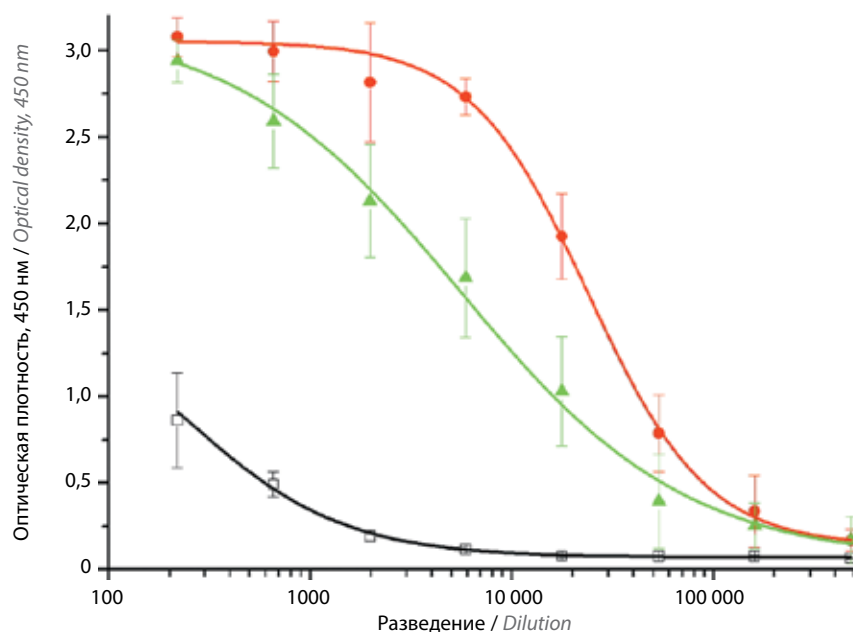


Рис. 4. Кривые связывания с адсорбированным в ИФА-платишках белком TagRFP-WT сывороток крови мышей после инокуляции опухолевых клеток 4T1 (черный), 4T1-TagRFP-WT (красный) и 4T1-TagRFP-L228A (зеленый). Приведены средние значения $\pm$ стандартные отклонения

Fig. 4. Binding curves of mice blood sera to the TagRFP-WT adsorbed in ELISA microplates after inoculation with 4T1 (black), 4T1-TagRFP-WT (red) and 4T1-TagRFP-L228A (green) tumor cells. Mean values $\pm$ standard deviations are shown

Таблица 2. Параметры аппроксимации экспериментальных кривых

Table 2. Approximation parameters for experimental curves

Показатель Parameter	Клетки опухоли Tumor cells		
	4T1	4T1-TagRFP-WT	4T1-TagRFP-L228A
χ^2	0,5944	0,1032	0,132
R^2	0,9789	0,9995	0,999
A1 (начальная) A1 (initial)	$1,668 \pm 1,67$	$3,052 \pm 0,095$	$3,166 \pm 0,376$
A2 (конечная) A2 (final)	$0,07 \pm 0,003$	$0,137 \pm 0,078$	$0,053 \pm 0,232$
Разведение при Y50 Dilution at Y50	—	24000 ± 4510	$5550,7 \pm 2880$

чем в 4 раза по сравнению с таковым у мышей с опухолями, экспрессирующими исходный белок TagRFP. Таким образом, одиночная замена L228A привела к существенному снижению гуморального иммунного ответа на экспрессируемый мутантный белок по сравнению с исходным.

Полученные средние значения были аппроксимированы с использованием программного обеспечения Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., США) сигмоидальными кривыми с параметрами, указанными в табл. 2.

Заключение

Таким образом, получены клеточные линии на основе линии 4T1, экспрессирующие красный флуоресцентный белок TagRFP и его мутант с единственной аминокислотной заменой TagRFP-L228A, а также мышинные опухолевые модели у мышей *Balb/c* на основе этих линий. Показано, что единственная аминокислотная замена в белке приводит к существенному уменьшению связывания с исходным ФБ сывороток крови мышей с флуоресцирующими опухолями, экспрессирующими мутантный белок,

по сравнению с теми мышами, флуоресцирующие опухоли которых экспрессировали исходный белок. В частности, значительно (более чем в 4 раза) уменьшается разведение сыворотки мышей, при котором связывание сыворотки составляет 1/2 от «насыщающего» значения. Таким образом, мутация L228A привела к существенному падению гуморального

иммунного ответа на экспрессируемый мутантный белок по сравнению с исходным. Полученные результаты позволяют использовать клеточные линии, экспрессирующие мутантный белок с пониженной иммуногенностью TagRFP-L228A, для создания оптимизированных опухолевых моделей у мышей *Balb/c*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V. et al. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J* 2009;418(3):567–74. DOI: 10.1042/BJ20081949
- Savitsky A.P., Meerovich I.G., Zherdeva V.V. et al. Three-dimensional *in vivo* imaging of tumors expressing red fluorescent proteins. In: *In Vivo Cellular Imaging Using Fluorescent Proteins*; Robert M. Hoffman (ed.), Springer Science+Business Media New York 2012, 872. DOI: 10.1007/978-1-61779-797-2_7
- Mishchenko T.A., Balalaeva I.V., Klimenko M.O. et al. Far-red fluorescent murine glioma model for accurate assessment of brain tumor progression. *Cancers (Basel)* 2022;14(15):3822. DOI: 10.3390/cancers14153822
- Kubota Y., Aoki Y., Wang A. et al. Non-invasive fluorescence imaging of breast cancer metastasis to the brain in an orthotopic nude-mouse model with very-narrow-band-width laser excitation of red fluorescent protein resulting in an ultra-bright signal without skin autofluorescence. *In Vivo* 2024;38(1):69–72. DOI: 10.21873/in vivo.13411
- Zherdeva V.V., Kazachkina N.I., Shcheslavskiy V., Savitsky A.P. Long-term fluorescence lifetime imaging of a genetically encoded sensor for caspase-3 activity in mouse tumor xenografts. *J Biomed Opt* 2018;23(3):1–11. DOI: 10.1117/1.JBO.23.3.03500
- Galluzzi L., Guilbaud E., Schmidt D. et al. Targeting immunogenic cell stress and death for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2024;23(6):445–60. DOI: 10.1038/s41573-024-00920-9
- Tan L., Shen X., He Zh., Lu Y. The role of photodynamic therapy in triggering cell death and facilitating antitumor immunology. *Front Oncol* 2022;12:863107. DOI: 10.3389/fonc.2022.863107
- Alzeibak R., Mishchenko T.A., Shilyagina N.Y. et al. Targeting immunogenic cancer cell death by photodynamic therapy: past, present and future. *J Immunother Cancer* 2021;9(1):e001926. DOI: 10.1136/jitc-2020-001926
- Chou W., Sun T., Peng N. et al. Photodynamic therapy-induced anti-tumor immunity: influence factors and synergistic enhancement strategies. *Pharmaceutics* 2023;15(1):2617. DOI: 10.3390/pharmaceutics15112617
- Hoffman R.M. Fluorescent proteins as visible *in vivo* sensors. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;113:389–402. DOI: 10.1016/B978-0-12-386932-6.00010-7
- Steinbauer M., Guba M., Cernaianu G. et al. GFP-transfected tumor cells are useful in examining early metastasis *in vivo*, but immune reaction precludes long-term tumor development studies in immunocompetent mice. *Clin Exp Metastasis* 2003;20(2):135–41. DOI: 10.1023/a:1022618909921
- Vodopyanov S.S., Kunin M.A., Garanina A.S. et al. Preparation and testing of cells expressing fluorescent proteins for intravital imaging of tumor microenvironment. *Bull Exp Biol Med* 2019;167(1):123–30. DOI: 10.1007/s10517-019-04475-312
- Huang L., Bommireddy R., Munoz L.E. et al. Expression of tdTomato and luciferase in a murine lung cancer alters the growth and immune microenvironment of the tumor. *PLoS One* 2021;16(8):e0254125. DOI: 10.1371/journal.pone.0254125
- Castano A.P., Liu Q., Hamblin M.R. A green fluorescent protein-expressing murine tumour but not its wild-type counterpart is cured by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2006;94(3):391–7. DOI: 10.1023/A:10226189099218
- Skelton D., Satake N., Kohn D.B. The enhanced green fluorescent protein (eGFP) is minimally immunogenic in C57BL/6 mice. *Gene Ther* 2001;8(23):1813–4. DOI: 10.1038/sj.gt.3301586
- Eyes T.J. Deimmunisation of enhanced green fluorescent protein. PhD Thesis. The University of Manchester (United Kingdom), 2014.
- NetMHC-4.0. URL: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHC-4.0/>.
- ElliPro. URL: <http://tools.iedb.org/ellipro>.
- DiscoTope-3.0 Structure Base Antibody Prediction. URL: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/DiscoTope-3.0>.
- Меерович И.Г., Марынич Н.К., Гавшина А.В., Савицкий А.П. Мутанты красного флуоресцентного белка TagRFP с пониженной иммуногенностью для использования во флуоресцирующих опухолевых моделях. В кн.: VI Международная конференция «Постгеном'2024», XI Российский симпозиум «Белки и пептиды», Российско-китайский конгресс в области наук о жизни. Сборник тезисов докладов. М.: Перо, 2024. Meerovich I.G., Marynich N.K., Gavshina A.V., Savitsky A.P. Mutants of the red fluorescent protein TagRFP with reduced immunogenicity for use in fluorescent tumor models. In the book: VI International Conference Postgenome'2024, XI Russian Symposium Proteins and Peptides, Russian-Chinese Congress in Life Sciences. Bulletin (Collection) of abstracts. Moscow: Pero Publishing House, 2024. (In Russ.).
- Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2010. P. 208–11. DOI: 10.1002/9780470649367

Вклад авторов

Н.К. Марынич: проведение сайт-направленного мутагенеза белков, клонирование полученных генов флуоресцентных белков в эукариотическую плазмиду, трансфекция опухолевых клеток, получение сывороток крови мышей, обсуждение и редактирование рукописи; А.В. Гавшина: расчет праймеров для сайт-направленного мутагенеза белков, проведение сайт-направленного мутагенеза белков, написание, обсуждение и редактирование рукописи;

И.Г. Меерович: обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, выбор мутаций, трансфекция опухолевых клеток эукариотическими плазмидами, селекция и получение индивидуальных клонов флуоресцирующих клеток; инокуляция опухолевых клеток мышам, отбор образцов крови мышей, иммуноферментный анализ сывороток крови мышей, анализ полученных данных, написание, обсуждение и редактирование рукописи.

Author's contributions

N.K. Marynich: conducting site-directed mutagenesis of proteins, cloning the obtained genes of fluorescent proteins into a eukaryotic plasmid, transfection of tumor cells mouse blood samples collection, writing, discussion and editing of manuscripts;

A.V. Gavshina: calculation of primers for site-directed mutagenesis of proteins, performing site-directed mutagenesis of proteins, writing, discussion and editing of the manuscript;

I.G. Meerovich: review of publications on the topic of the article, development of the study design, selection of mutations, transfection of tumor cells with eukaryotic plasmids, selection and production of individual clones of fluorescent cells; inoculation of tumor cells to mice, mouse blood samples collection, ELISA of mouse blood serum, analysis of the obtained data, writing, discussion and editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.К. Марынич / N.K. Marynich: <https://orcid.org/0000-0003-1032-0959>

А.В. Гавшина / A.V. Gavshina: <https://orcid.org/0000-0002-2822-5143>

И.Г. Меерович / I.G. Meerovich: <https://orcid.org/0000-0001-9732-8149>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-24-00550).

Funding. The research was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 24-24-00550).

Соблюдение правил биоэтики. В ходе исследования были соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных. Вся экспериментальная работа осуществлялась в соответствии с нормами Международных рекомендаций по биомедицинским исследованиям (International Recommendations for Biomedical Research (CIOMS)), национальных руководств и правил учреждения по содержанию и использованию лабораторных животных. Протоколы исследований на животных одобрены этическим комитетом ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» (решение №3/2024).

Compliance with the rules of bioethics. All applicable international, national and/or institutional principles of animal care and use were followed during the study. All experimental work was carried out in accordance with the norms of the International Recommendations for Biomedical Research (CIOMS), as well as national guidelines and rules established by the institution regarding housing and usage of laboratory animals. Animal research protocols were approved by the Ethics Committee of the Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences (Decision No. 3/2024).

Статья поступила: 10.06.2025. Принята к публикации: 25.08.2025. Опубликовано онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 10.06.2025. Accepted for publication: 25.08.2025. Published online: 25.09.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-45-52>

Новое производное N-гликозида индола[2,3-а]карбазола ЛХС-1269, обладающее противоопухолевой активностью на перевиваемых опухолях мышей

М.П. Киселева, И.С. Голубева, Л.М. Борисова, Г.Б. Смирнова, Ю.А. Борисова, А.В. Ланцова, Д.В. Гусев, З.С. Шпрах

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Марина Петровна Киселева marina-kiselyova@mail.ru

Введение. Исследование новых представителей N-гликозидов индола[2,3-а]карбазола, обладающих широким спектром биологической активности, остается актуальным направлением в создании высокоэффективных противоопухолевых препаратов.

Цель исследования – оценка эффективности лиофилизированной лекарственной формы нового производного N-гликозид индолакарбазола 6-пиколинамидо-12-(β-D-ксилопиранозил)индола[2,3-а]пиррола[3,4-с]карбазол-5,7-дион (ЛХС-1269-лио) на перевиваемой аденокарциноме толстой кишки мышей (АКАТОЛ) и ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620.

Материалы и методы. В исследованиях на самках мышей *Balb/c* с перевитой подкожно АКАТОЛ использовали режим однократного внутривенного введения ЛХС-1269-лио в дозах 80, 90, 100 и 120 мг/кг и ежедневного 5-кратного – в дозах 80 и 90 мг/кг. Изучение эффективности ЛХС-1269-лио на SW620 проводили в дозах 60 и 90 мг/кг при ежедневном 5-кратном внутривенном введении мышам-самкам *Balb/c* nude с подкожно перевитыми ксенографтами SW620. Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухолей и увеличению продолжительности жизни животных, получавших ЛХС-1269-лио, по сравнению с контрольными.

Результаты. При однократном воздействии доз 80, 90, 100 и 120 мг/кг на АКАТОЛ наблюдали дозозависимый достоверный противоопухолевый эффект ЛХС-1269-лио по отношению к контрольной группе мышей. ЛХС-1269-лио при 5-кратном внутривенном введении в дозах 80 и 90 мг/кг (суммарные дозы 400 и 450 мг/кг) достоверно ингибировал рост АКАТОЛ на 89–88 и 86–84 % ($p < 0,05$) в течение 30 сут наблюдения и увеличивал продолжительность жизни мышей *Balb/c* на 36 и 54 % соответственно. Результативность применения ЛХС-1269-лио в суммарной дозе 450 мг/кг на АКАТОЛ подтверждена активностью ЛХС-1269-лио на ксенографтах SW620 у мышей *Balb/c* nude с торможением роста опухолей 72,9–71,0 % ($p < 0,05$) в течение 8 сут наблюдения.

Заключение. Результаты оценки противоопухолевой активности ЛХС-1269 в лиофилизированной лекарственной форме на модели перевиваемой АКАТОЛ и на подкожных ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620 позволяют продолжить доклинические исследования препарата.

Ключевые слова: производное индолакарбазола ЛХС-1269, перевиваемая опухоль мышей, подкожный ксенографт, торможение роста опухоли

Для цитирования: Киселева М.П., Голубева И.С., Борисова Л.М. и др. Новое производное N-гликозида индола[2,3-а]карбазола ЛХС-1269, обладающее противоопухолевой активностью на перевиваемых опухолях мышей. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):45–52.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-45-52>

A new indolo[2,3-a]carbazole N-glycoside derivative LCS-1269 with antitumor activity on transplantable mice tumors

Marina P. Kiseleva, Irina S. Golubeva, Larisa M. Borisova, Galina B. Smirnova, Julia A. Borisova, Anna V. Lantsova, Dmitry V. Gusev, Zoya S. Shprakh

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Marina Petrovna Kiseleva marina-kiselyova@mail.ru

Background. The study of new representatives of indolo[2,3-a]carbazole N-glycosides with a biological activity broad spectrum remains a relevant direction in the highly effective antitumor drugs creation.

Aim. To evaluate the efficacy of the lyophilized dosage form of a new derivative of indolocarbazole N-glycoside 6-picolinamido-12-(β-D-xylopyranosyl)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione (LCS-1269-lyo) on transplantable mice colon adenocarcinoma (CAC) and on SW620 human colon cancer xenografts.

Materials and methods. In studies on female *Balb/c* mice with subcutaneously (s.c.) transplanted CAC, a single intravenous (i.v.) administration of LCS-1269-lyo was used at doses of 80, 90, 100, 120 mg/kg and five-time administration daily at doses of 80 and 90 mg/kg. The LCS-1269-lyo study on SW620 effectiveness was carried out at doses of 60 and 90 mg/kg with five-time daily intraperitoneal (i.p.) administration to male *Balb/c* nude mice with subcutaneously transplanted SW620 xenografts. The antitumor effect was assessed by tumor growth inhibition and an increase in the lifespan of animals receiving LCS-1269-lyo, compared to the controls.

Results. A dose-dependent reliable antitumor effect of LCS-1269-lyo was observed on CAC after a single exposure at doses of 80, 90, 100 and 120 mg/kg compared to the control group of mice. LCS-1269-lyo, when administered intravenously five times at doses of 80 and 90 mg/kg (total doses of 400 and 450 mg/kg), significantly inhibited CAC growth by 89–88 and 86–84 % ($p < 0,05$) over 30 days of observation and increased the life span of *Balb/c* mice by 36 and 54 %, respectively. The LCS-1269-lyo effectiveness in a total dose of 450 mg/kg on CAC has been confirmed by the activity of LCS-1269-lyo on SW620 xenografts in *Balb/c* nude mice with tumor growth inhibition 72,9–71,0 % ($p < 0,05$) during 8 days of observation.

Conclusion. The results of the antitumor activity evaluation of LCS-1269 in a lyophilized dosage form on the model of CAC mice transplantable colon adenocarcinoma and on human colon cancer SW620 subcutaneous xenografts allow to continue preclinical studies of the drug.

Keywords: indolocarbazole derivative LCS-1269, transplantable tumor of mice, subcutaneous xenograft, tumor growth inhibition

For citation: Kiseleva M.P., Golubeva I.S., Borisova L.M. et al. A new indolo[2,3-a]carbazole n-glycoside derivative LCS-1269 with antitumor activity on transplantable mice tumors. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(3):45–52. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-45-52>

Введение

Индолокарбазолы представляют большую группу природных и синтетических соединений с различными видами биологической активности, в том числе противоопухолевой. Открытие ряда биологических свойств при исследовании N-гликозидов индоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазола стимулировало поиск и создание активных противоопухолевых агентов среди их синтетических аналогов и низкомолекулярных производных [1, 2].

К настоящему времени накоплена обширная база данных об антипролиферативной активности индолокарбазолов различной химической структуры, позволяющая считать соединения этого класса перспективными для изучения. В процессе исследования производных N-гликозидов индоло[2,3-a]карбазола в качестве потенциальных противоопухолевых агентов отмечается их способность при взаимодействии с несколькими внутриклеточными мишенями вызывать разные пути гибели опухолевых клеток. Это позволяет расширить диапазон их противоопухолевого действия и влияет на избирательность (специфичность) воздействия, исключая или отодвигая возникновение устойчивости опухоли к проводимому лечению [3].

Различные производные индоло[2,3-a]карбазола изучены в клинических исследованиях за рубежом. Среди наиболее хорошо исследованных препаратов следует выделить стауроспорин и ряд его аналогов — мидостаурин [4], энзастаурин [5], сотрастаурин [6], лестауртиниб [7], а также аналоги ребеккамицина — эдотекарин [8] и бекатекарин [9]. При проведении исследований некоторые тестируемые препараты продемонстрировали широкий спектр показаний к применению и хорошую сочетаемость с известными лекарственными средствами (ЛС), но при наличии выраженной токсичности, прежде всего гематологической. Так, 7-гидроксипроизводное стауроспорина UCN-01 прошло II фазу клинических испытаний в лечении гемобластозов, солидных опухолей, меланомы и мелкоклеточного рака легких, но клинические исследования UCN-01 были затруднены из-за его высокого связывания с белками плазмы крови человека. Однако дальнейшее исследование показало, что у пациенток с диагнозом рака молочной железы применение UCN-01 в низких дозах за определенный промежуток времени до начала гормональной терапии позволяло увеличивать дозу цитотоксических препаратов и минимизировать при этом их токсичность [10].

Оценивая эффективность энзастаурина в комбинации с бевацизумабом при рецидивах злокачественных глиом, отмечали хорошую переносимость и выживаемость пациентов, несмотря на токсичность, которая проявлялась лимфопенией, гипофосфатемией и тромбообразованием [11].

Водорастворимый бекатекарин по результатам клинических исследований обладал управляемой токсичностью и умеренной эффективностью при лечении мелкоклеточного рака легкого, однако не имел значительных преимуществ по сравнению с существующими препаратами [9].

В современной клинической практике применяется только мидостаурин для лечения миелоидного лейкоза с активирующей мутацией тирозинкиназы FLT3, а также для лечения мастоцитоза, связанного с наличием мутантных форм тирозинкиназы KIT (CD117) [4].

Несмотря на то что эффективность тестируемых препаратов оказалась сопоставимой с таковой применяемых в клинике химиотерапевтических препаратов, изыскание новых представителей N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазола и использование их в качестве противоопухолевых средств с улучшенными свойствами позволит увеличить потенциал их клинического применения. В этом направлении продолжают публиковаться научные сообщения об открытии новых природных и синтетических производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазола, изучение которых поможет расширить спектр их известных биологических свойств.

В лаборатории химического синтеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина проводятся работы по синтезу N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов. В стадии разработки находится производное индолокарбазола 6-пиколинамидо-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион (ЛХС-1269) [12]. В лаборатории разработки лекарственных форм создана инъекционная лекарственная форма на основе ЛХС-1269 [13].

Исследованиями *in vitro* установлено, что ЛХС-1269 эффективно влияет на васкулогенную микроциркуляцию, подавляет механизм ангиогенеза, связанный с фактором роста эндотелия сосудов, приводит к снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли [14]. Кроме того, ЛХС-1269 вызывает изменение экспрессии генов, вовлеченных в апоптоз, клеточное старение, регуляцию метаболизма в условиях гипоксии, ответ на повреждение ДНК и активацию репарации [15].

На культуре клеток HeLa обнаружено влияние ЛХС-1269 на метилирование ДНК, локализацию гистона H1, ремоделирование хроматина и реактивацию эпигенетически молчащих генов [16].

Значимая цитотоксическая и противоопухолевая активность ЛХС-1269 показана на опухолевых клеточных линиях человека НСТ-116, НТ-29, MCF-7, A549, U251 [15, 16] и моделях перевиваемых опухолей мышей: аденокарциноме толстой кишки (АКАТОЛ), аденокарциноме молочной железы (Ca-755), раке шейки матки (РШМ-5), эпидермоидной карциноме легкого Льюис (LLC) [17].

В данной работе представлены результаты исследования нового производного N-гликозида индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1269 — лиофилизата для приготовления раствора для инъекций (ЛХС-1269-лио) на перевиваемой АКАТОЛ и на ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620.

Цель исследования — оценка эффективности лиофилизированной лекарственной формы нового производного ЛХС-1269-лио на АКАТОЛ и ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620.

Материалы и методы

Работу выполняли на половозрелых мышах самках линии *Balb/c* и самцах *Balb/c* nude массой тела 20–22 г. Перед введением ЛС животных распределяли по группам с численностью, достаточной для оценки и расчета показателей достоверности. Число животных в контрольных группах составляло 10 мышей, в опытных группах — по 6–7 особей.

В качестве опухолевой модели использовали АКАТОЛ, впервые возникшую в 1971 г. из подкожного сингенного трансплантата толстой кишки эмбриона у мыши *Balb/c* [18]. Для эксперимента трансплантацию опухолевых клеток АКАТОЛ (5-й пассаж) проводили подкожно в правую подмышечную впадину каждой мыши по 0,5 мл опухолевой взвеси АКАТОЛ в среде 199 в разведении 1:10 (5×10^6 клеток). Введение ЛС начинали через 48 ч после инокуляции. Начало введения соответствовало времени интенсивного размножения опухолевых клеток, что обеспечивало их нахождение в наиболее чувствительном к химиотерапии состоянии [19].

В экспериментах на иммунодефицитных мышах использовали штамм перевиваемого рака ободочной кишки человека SW620, растущий в виде подкожных ксенографтов [20]. Ампулу, содержащую 1,0 мл 20 % опухолевой взвеси, получали из криобанка центра коллективного пользования «Биоресурсная коллекция опухолевых образцов, клеточных линий и моноклональных антител» НМИЦ им. Н.Н. Блохина, размораживали *ex tempore* в термостате в течение 10 мин при температуре 37 °С. В условиях ламинара опухолевую взвесь имплантировали под кожу бока 2 мышам-самцам *Balb/c* nude по 0,5 мл на мышь (первый пассаж). После достижения объема 0,8–1,0 см³ полученные узлы пассивировали на четырех мышах-донорах для получения 20 % трансплантационной

массы опухоли. Каждой мыши *Balb/c nude* под кожу бока трансплантировали по 0,2 мл 20 % взвеси в питательной среде 199, т.е. по 40 мг опухолевой ткани. Введение ЛС начинали через 48 ч после трансплантации.

Исследуемое лекарственное средство

Лекарственная форма ЛХС-1269 — лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 25 мг (ЛХС-1269-лио). Для получения раствора для внутривенного введения содержимое каждого флакона регидратировали, добавляя воду для инъекций до концентрации 5 мг/мл [13].

В исследованиях на АКАТОЛ использовали режим однократного введения ЛХС-1269-лио в дозах 80, 90, 100, 120 мг/кг и ежедневного 5-кратного введения в дозах 80 и 90 мг/кг в вену хвоста мышей.

Изучение эффективности ЛХС-1269-лио на SW620 проводили в дозах 60 и 90 мг/кг при ежедневном 5-кратном внутривенном введении мышам *Balb/c nude*.

Оценка противоопухолевого эффекта

Эффективность применения ЛХС-1269-лио оценивали по торможению роста опухоли (ТРО), которое вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО, \%} = (V_k - V_o) / V_k \times 100, \quad (1)$$

где V_k и V_o — средний объем опухолей (мм³) в контрольной и опытной группах соответственно.

Для расчета ТРО трехкратно измеряли линейные (a , b и c) размеры опухолей у мышей и на каждый срок вычисляли средний объем по формуле:

$$V_{\text{ср}} = 1/2\pi \times a \times b \times c. \quad (2)$$

Определение объема опухолей проводили после окончания введения ЛС и далее на каждые 4-е сутки. Для мышей *Balb/c nude* определяли индекс прироста опухоли (ИПО) как соотношение величин средних объемов опухолей после трансплантации SW620 и затем на каждые 4-е сутки до окончания эксперимента.

Эффективность действия ЛС у мышей с АКАТОЛ также оценивали по увеличению продолжительности жизни (УПЖ) животных, получивших ЛС, по сравнению с контрольными, которое вычисляли по следующей формуле:

$$\text{УПЖ, \%} = (\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k) / \text{СПЖ}_k \times 100, \quad (3)$$

где СПЖ_o и СПЖ_k — средняя продолжительность жизни (сут) в каждой опытной и контрольной группах животных соответственно.

На АКАТОЛ эффективными считали дозы ЛХС-1269-лио, вызывающие ТРО ≥ 70 % продолжительностью не менее 7 сут после окончания введения ЛС и УПЖ ≥ 25 % [19].

При оценке противоопухолевой активности ЛХС-1269-лио на ксенографтах SW620 применяли минимальный критерий для эксперимента ТРО > 50 %.

Оценка переносимости лекарственного средства

В период проведения эксперимента наблюдали за состоянием и поведением мышей. Побочное действие ЛХС-1269-лио оценивали по уменьшению массы тела (≥ 20 %) и срокам гибели животных, получавших ЛС, в сравнении с гибелью животных контрольной группы.

Статистическая оценка результатов

Статистический анализ проводили с использованием компьютерных программ Statistica 6.0, Excel 2013 и Excel для Windows 2007 путем расчета критерия Т-тест Фишера. Различия между сравниваемыми группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование эффективности применения ЛХС-1269-лио на АКАТОЛ

При однократном внутривенном воздействии доз 80, 90, 100 и 120 мг/кг на АКАТОЛ наблюдали дозозависимый статистически значимый противоопухолевый эффект ЛХС-1269-лио по сравнению с контрольной группой мышей (рис. 1). Применение однократной дозы ЛХС-1269-лио 100 и 120 мг/кг приводило к гибели 17 % животных в этих группах на 4-е сутки после окончания введения ЛС. Признаки токсичности выражались в снижении двигательной активности, уменьшении массы тела животных на 30 % по сравнению с исходной, а также в значительном уменьшении (в 2–3 раза) массы селезенки при аутопсии по сравнению с массой селезенки у мышей контрольной группы.

ЛХС-1269-лио при режиме 5-кратного внутривенного введения в дозах 80 и 90 мг/кг (суммарные дозы 400 и 450 мг/кг) статистически значимо ингибировал рост АКАТОЛ на 89–88 и 86–84 % ($p < 0,05$ к контролю) в течение 30 сут наблюдения (рис. 1) и увеличивал продолжительность жизни мышей на 36 и 54 % соответственно.

Исследование эффективности ЛХС-1269-лио на подкожных ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620

Результаты исследования ЛХС-1269-лио на опухоли человека у мышей *Balb/c nude* показали, что подкожные ксенографты рака ободочной кишки SW620

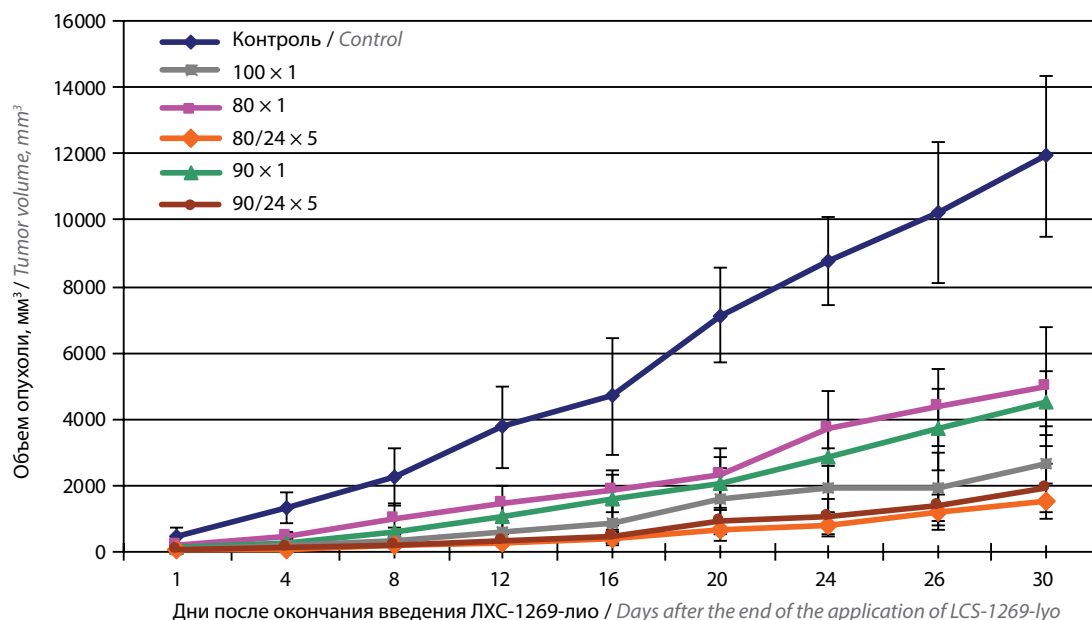


Рис. 1. Изменение размеров опухоли АКАТОЛ мышей в разных режимах внутривенного применения ЛХС-1269-лио

Fig. 1. Changes in tumor size of colon adenocarcinoma (CAC) mice in different intravenous regimens of LCS-1269-lyo

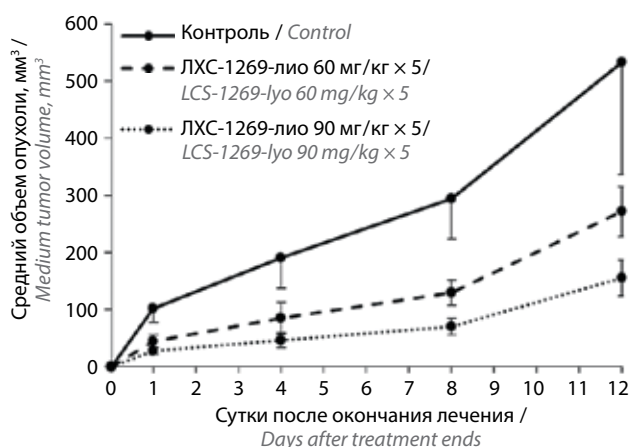


Рис. 2. Динамика роста SW620 под действием ЛХС-1269-лио

Fig. 2. Dynamics of SW620 growth under the action of LCS-1269-lyo

контрольной группы (контроль роста опухоли + вода для инъекций) имели устойчивую динамику роста (рис. 2). Опухолевые узлы увеличивались в течение 8 сут после трансплантации от $V_{cp} = 101,3 \pm 24,0 \text{ мм}^3$ до $V_{cp} = 533,0 \pm 196,7 \text{ мм}^3$ с ИПО = 5,3 (табл. 1).

Начиная с 1-х суток после окончания внутрибрюшинного введения ЛХС-1269-лио в дозе 60 мг/кг (суммарная доза 300 мг/кг) и до 8-х суток наблюдения у мышей *Balb/c nude* отмечали статистически значимый противоопухолевый эффект на уровне ТРО = 56,3–49,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных. В течение всего срока и после окончания введения ЛС переносимость была удовлетворительной. Максимальная потеря массы

тела составила 1,9 % (рис. 3). Гибели мышей от токсичности не отмечали.

В группе мышей, получавших внутрибрюшинно ЛХС-1269-лио в дозе 90 мг/кг (суммарная доза 450 мг/кг), отмечали статистически значимый противоопухолевый эффект на уровне ТРО = 72,9–71,0 % ($p < 0,05$ по сравнению с контролем). На 4-е сутки после окончания введения ЛС наблюдали $\text{max ТРО} = 76,4 \%$. Переносимость ЛХС-1269-лио была удовлетворительной. Максимальная потеря массы тела – 5,5 % (см. рис. 3). Гибели от токсичности не наблюдали.

Полученные результаты демонстрируют высокую активность изученных доз ЛХС-1269-лио при прямой зависимости противоопухолевого эффекта от величины суммарной дозы (см. табл. 1, рис. 2).

Таким образом, результативность применения ЛХС-1269-лио в суммарной дозе 450 мг/кг на переносимой опухоли мышей АКАТОЛ подтверждена активностью ЛХС-1269-лио в исследованиях на ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620.

Эффективность ЛХС-1269-лио на SW620 сопоставима с результатами, полученными при оценке антипролиферативной активности других представителей класса индолокарбазолов.

Так, экспериментальное исследование производного N-гликозид индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1208, изученного в диапазоне суммарных доз от 50 до 150 мг/кг на ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620 *in vivo*, показало его высокую эффективность в ингибировании роста опухоли на уровне критерия «опухоль/контроль» (tumor/control – Т/С, %): Т/С = 35–2 %, где Т/С = 100 % в контрольной

Таблица 1. Противоопухолевая активность ЛХС-1269-лио при 5-кратном внутривнутрибрюшинном введении мышам с подкожно трансплантированным раком ободочной кишки человека SW620

Table 1. Antitumor activity of LCS-1269-lyo after five times intraperitoneal administration to mice with subcutaneously transplanted human colon cancer SW620

Показатель Indicator	Эффективность ЛХС-1269-лио после окончания введения, сут Efficacy of LCS-1269-lyo for the period after the end of application, day								
	1 сут 1 days			4 сут 4 days			8 сут 8 days		
	КРО* TGC*	ЛХС-1269-лио, мг/кг LCS-1269-lyo, mg/kg		КРО* TGC*	ЛХС-1269-лио, мг/кг LCS-1269-lyo, mg/kg		КРО* TGC*	ЛХС-1269-лио, мг/кг LCS-1269-lyo, mg/kg	
		60	90		60	90		60	90
Средний объем опухоли, мм³ Medium tumor volume, mm³	101,3	44,2	27,4	190,9	85,3	45,1	533,0	271,5	154,6
Стандартное отклонение Standard deviation	24,0	11,1	6,1	53,8	26,9	11,5	196,7	43,3	31,6
Торможение роста опухоли, % Tumor growth inhibition. %	—	56,3	72,9	—	55,3	76,4	—	49,1	71,0

*КРО — контроль роста опухоли.

*TGC — tumor growth control.

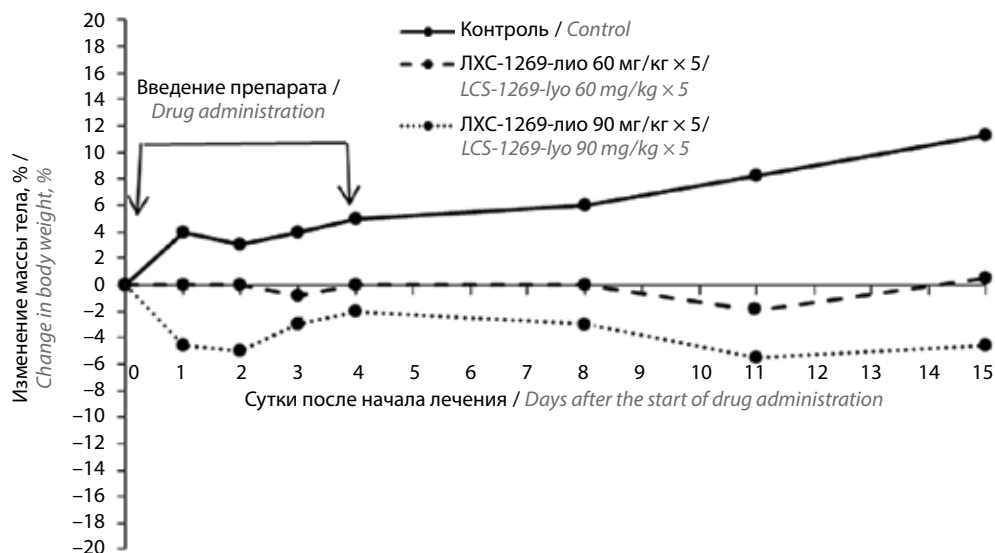


Рис. 3. Изменение массы тела мышей Balb/c nude до, во время и после окончания введения ЛХС-1269-лио

Fig. 3. Changes in body weight of Balb/c nude mice before, during, and after the end of LCS-1269-lyo administration

группе, а максимальный критерий для экспериментов — $T/C \leq 42\%$ [21].

Из зарубежных представителей производных индолокарбазола высокую противоопухолевую активность на модели ксенографта рака толстой кишки человека НСТ-116 *in vivo* проявил эдотекарин [22].

Аналог стауроспорина СЕР-7055 в монотерапии и в сочетании с темозоломидом, иринотеканом и оксалиплатином ингибировал рост опухолевых клеток на ортотопической модели рака толстой кишки НТ-29 у мышей [23], что подтверждает целесообразность

применения производных индолокарбазола в клинических условиях для пациентов с аналогичной локализацией опухолевого процесса.

Заключение

Оценка противоопухолевой активности ЛХС-1269 в лиофилизированной лекарственной форме на модели перевиваемой аденокарциномы толстой кишки мышей АКАТОЛ и подкожных ксенографтах рака ободочной кишки человека SW620 позволяет продолжить доклинические исследования препарата.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Козин Д.А., Шпрах З.С., Решетняк В.Ю. и др. Производные индоло[2,3-а]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования. Разработка и регистрация лекарственных средств 2020;9(4):15–20. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135 Kozin D.A., Shprakh Z.S., Reshetnyak V.Yu. et al. Indolo[2,3-a] carbazole derivatives with antitumor activity and instrumental methods for their investigation. *Razrabotka y registratsiya lekarstvennykh sredstv* = Drug Development & Registration. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135
2. Колпаксиди А.П., Дмитриева М.В., Ярош И.В., Краснюк И.И. Противоопухолевые препараты на основе производных индолокарбазола. Фармация и фармакология 2021;9(4):252–65. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-252-265 Kolpaksidi A.P., Dmitrieva M.V., Yarosh I.V., Krasnyuk I.I. Antitumor drugs based on indolocarbazole derivatives. *Farmatsiya y farmakologiya* = Pharmacy & Pharmacology 2021;9(4):252–65. (In Russ.). DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-252-265
3. Zenkov R.G., Ektova L.V., Vlasova O.A. et al. Indolo[2,3-a] carbazoles: diversity, biological properties, application in antitumor therapy. *Chem Heterocycl Compd (N Y)* 2020;56(6):644–58. DOI: 10.1007/s10593-020-02714-4
4. Stone R.M., Manley P.W., Larson R.A., Capdeville R. Midostaurin: its odyssey from discovery to approval for treating acute myeloid leukemia and advanced systemic mastocytosis. *Blood Adv* 2018;2(4):444–53. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017011080
5. He Y., Li J., Ding N. et al. Combination of Enzastaurin and Ibrutinib synergistically induces anti-tumor effects in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38(1):86. DOI: 10.1186/s13046-019-1076-4
6. Yuan Y., Yangmei Z., Rongrong S. et al. Sostrastaurin attenuates the stemness of gastric cancer cells by targeting PKC δ . *Biomed Pharmacother* 2019;117:109165. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109165
7. Mascarenhas J., Baker M.R., Kessler C. et al. Phase II trial of Lestaurinib, a JAK2 inhibitor, in patients with myelofibrosis. *Leuk Lymphoma* 2019;60(5):1343–5. DOI: 10.1080/10428194.2018.1532509
8. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 9808998, Edotecarin. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Edotecarin>.
9. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 101524, Becatecarin. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Becatecarin>.
10. Mull B.B., Livingston J.A., Patel N. et al. Specific, reversible G1 arrest by UCN-01 in vivo provides cytostatic protection of normal cells against cytotoxic chemotherapy in breast cancer. *Br J Cancer* 2020;122(6):812–22. DOI: 10.1038/s41416-019-0707-z
11. Oda Y., Iwamoto F.M., Moustakas A. et al. A phase II trial of enzastaurin (LY317615) in combination with bevacizumab in adults with recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol* 2016;127(1):127–35. DOI: 10.1007/s11060-015-2020-x
12. Эктова Л.В., Еремина В.А., Тихонова Н.И. и др. Синтез и цитотоксическая активность N-гликозидов индоло[2,3-а]-пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионов, замещенных по малемидному атому азота. *Химико-фармацевтический журнал* 2020;54(5):26–9. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-5-26-29 Ektova L.V., Eremina V.A., Tikhonova N.I. et al. Synthesis and cytotoxic activity of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione n-glycosides substituted on the maleimide nitrogen atom. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* = Pharmaceutical Chemistry Journal 2020;54(5):455–8. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-5-26-29
13. Николаева Л.Л., Ланцова А.В., Санарова Е.В. и др. Разработка состава и технологии получения модели инъекционной формы производного индолокарбазола. *Химико-фармацевтический журнал* 2023;57(6):42–6. DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-6-42-46 Nikolaeva L.L., Lantsova A.V., Sanarova E.V. et al. Development of the composition and technology for obtaining a model of an injection form of an indolocarbazole derivative. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* = Pharmaceutical Chemistry Journal 2023;57(6):42–6. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-6-42-46
14. Tchurikov N.A., Vartanian A.A., Klushevskaya E.S. et al. Bipolar action of inhibitor of vasculogenic mimicry on gene expression in melanoma cells. *Mol Biol (Mosk)* 2024;58(2):289–99. DOI: 10.1134/S0026893324020055
15. Kalitin N.N., Ektova L.V., Kostitsa N.S. et al. A novel glycosylated indolocarbazole derivative LCS 1269 effectively inhibits growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo* through driving of both apoptosis and senescence by inducing of DNA damage and modulating of AKT/mTOR/S6K and ERK pathways. *Chem Biol Interact* 2022;364:110056. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110056
16. Zenkov R.G., Vlasova O.A., Maksimova V.P. et al. Molecular mechanisms of anticancer activity of N-Glycosides of indolocarbazoles LCS-1208 and LCS-1269. *Molecules* 2021;26(23):7329. DOI: 10.3390/molecules26237329
17. Голубева И.С., Яворская Н.П., Эктова Л.В. и др. Противоопухолевая активность некоторых производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов с углеводным остатком ксилозой. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(4):86–93. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-86-93 Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Ektova L.V. et al. Antitumor activity of some derivatives of indolo[2,3-a]carbazoles N-glycosides with xylose carbohydrate residue. *Rossiiskij bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(4):86–93. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-86-93
18. Трещалина Е.М., Смирнова Г.Б., Андронova Н.В. Коллекция опухолевых штаммов животных для экспериментальной химиотерапии злокачественных опухолей. М.: Практическая медицина, 2022. 96 с. Treshchalina E.M., Smirnova G.B., Andronova N.V. Collection of animal tumor strains for experimental chemotherapy of malignant tumors. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2022. 96 p. (In Russ.).
19. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К., 2012. Ч. 1. С. 642–657. Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Methodical recommendations for the preclinical study of the antitumor activity of drugs. In: Guidance on preclinical studies of drugs. Moscow: Grif i K., 2012. Part 1. P. 642–657. (In Russ.).
20. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши *Balb/c* nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):6–13. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13 Treshalina E.M. Immunodeficient mice *Balb/c* nude and modeling of various types of tumor growth for preclinical studies. *Rossiiskij bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(3):6–13. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13

21. Kiseleva M.P., Borisova L.M., Smirnova G.B. et al. Antiproliferative activity of a new derivative from the class of N-glycoside of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles. *Research Results in Pharmacology* 2022;8(2):49–57. DOI: 10.3897/rpharmacology.8.79424
22. Ciomi M., Croce V., Ciavolella A. et al. Antitumor efficacy of edotecarin as a single agent and in combination with chemotherapy agents in a xenograft model. *Clin Cancer Res* 2006;12(9):2856–61. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1859
23. Jones-Bolin S., Zhao H., Hunter K. et al. The effects of the oral, pan-VEGF-R kinase inhibitor CEP-7055 and chemotherapy in orthotopic models of glioblastoma and colon carcinoma in mice. *Mol Cancer Ther* 2006;5(7):1744–53. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0327

Вклад авторов

М.П. Киселева: написание текста рукописи, обработка результатов исследования, обзор публикаций по теме статьи;
 И.С. Голубева: проведение эксперимента *in vivo*, анализ результатов исследования;
 Л.М. Борисова: разработка дизайна эксперимента, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи;
 Г.Б. Смирнова: получение результатов эксперимента для анализа, анализ полученных результатов;
 Ю.А. Борисова: проведение эксперимента *in vivo*, получение данных для анализа;
 А.В. Ланцова: разработка лекарственной формы ЛХС-1269-лио;
 Д.В. Гусев: синтез, очистка и характеристика субстанции ЛХС-1269;
 З.С. Шпрах: разработка дизайна исследования, редактирование текста статьи.

Author's contributions

M.P. Kiseleva: manuscript writing, processing the research results, review of publications on the topic of the article;
 I.S. Golubeva: conducting an *in vivo* experiment, analysis of research results;
 L.M. Borisova: research design development, discussion of the results, editing the text of the manuscript;
 G.B. Smirnova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data; research on mice;
 J.A. Borisova: conducting an *in vivo* experiment, obtaining data for analysis;
 A.V. Lantsova: development of LCS-1269 dosage form;
 D.V. Gusev: synthesis, purification and characterization of the LCS-1269 substance;
 Z.S. Shprakh: research design development, editing the text of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.П. Киселева / M.P. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-4309-6722>
 И.С. Голубева / I.S. Golubeva: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7444>
 Л.М. Борисова / L.M. Borisova: <https://orcid.org/0000-0003-4613-4584>
 Г.Б. Смирнова / G.B. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0002-4599-7284>
 Ю.А. Борисова / J.A. Borisova: <https://orcid.org/0000-0002-0073-7729>
 А.В. Ланцова / A.V. Lantsova: <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>
 Д.В. Гусев / D.V. Gusev: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8265>
 З.С. Шпрах / Z.S. Shprakh: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено в рамках государственного задания по теме «Доклиническая и фармацевтическая разработка оригинального отечественного противоопухолевого лекарственного средства ингибитора топоизомеразы I с целью проведения клинических исследований (приоритетные исследования)», № 123021500024-4, 2023–2025 гг.

Funding. The study was conducted within the framework of the state assignment on the topic “Preclinical and pharmaceutical development of an original domestic antitumor drug topoisomerase I inhibitor for the purpose of conducting clinical trials (priority studies)”, No. 123021500024-4, 2023–2025.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен на заседании локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», заключение № 10р-2024.

Conformity of the principles of bioethics. The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes. The protocol of the experiment was approved at a meeting of the local ethical committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, approval report No. 10р-2024.

Статья поступила: 26.12.2024. Принята к публикации: 11.07.2025. Опубликовано онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 26.12.2024. Accepted for publication: 11.07.2025. Published online: 25.09.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-53-62>

Оптимизация процесса влажной грануляции методом поверхностного отклика при получении таблеток ГСБ-106

С.В. Тишков, Е.В. Блынская, К.В. Алексеев, В.Л. Дорофеев

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

Контакты: Сергей Валерьевич Тишков tishkov_sv@academpharm.ru

Введение. Ключевым компонентом фармацевтической разработки являются оптимизация и обоснование технологических процессов, поскольку влияние критических параметров процесса на критические параметры качества составляет одно из измерений проектного поля, в рамках которого создается лекарственный препарат. В данном исследовании показана взаимосвязь между условиями влажного гранулирования и характеристиками таблеток ГСБ-106.

Цель исследования – изучить влияние критических параметров процесса влажного гранулирования на основные показатели таблеток ГСБ-106 при разработке оптимального технологического режима, используя план Бокса–Бенкена.

Материалы и методы. Используемое оборудование: высокоскоростной смеситель-гранулятор GSL-12 (Etorch, Китай), гранулятор с функцией просеивания WG-30 (Pharmag, Германия), ручной гидравлический пресс ПРГ-50 (Россия), анализаторы: прочности – TBF 1000 (Copley Scientific, Великобритания), распадаемости – SVM 221 (ERWEKA, Германия), истираемости – PTF 3DR (Pharma Test, Германия). Математическое планирование эксперимента осуществляли с использованием метода поверхностного отклика с трехуровневым планом Бокса–Бенкена, применяли регрессионный и дисперсионный анализ, многокритериальную оптимизацию с помощью обобщенной желательности по Дерринжеру–Суичу.

Результаты. Для разработки технологического процесса проведено 15 экспериментов во всем диапазоне варьирования факторов, таких как продолжительность перемешивания, скорость вращения лопастей, количество гранулирующего раствора. Изучали следующие фармацевтико-технологические характеристики: прочность таблеток на раздавливание и распадаемость при давлении прессования 5 и 10 кН/м², а также истираемость. Исходя из полученных данных, разрабатывали уравнения регрессионного анализа для каждой изучаемой характеристики, сравнивали полученные модели по коэффициентам детерминации, оценивали статистическую значимость членов уравнений и оптимизировали уравнения регрессии путем избавления от статистически незначимых членов уравнения. После построения математической модели с адекватной прогностической способностью проводили многокритериальную оптимизацию с помощью обобщенной желательности по Дерринжеру–Суичу.

Заключение. Многокритериальная оптимизация позволила определить наиболее оптимальное сочетание управляющих факторов в соответствии с приоритизацией желательности фармацевтико-технологических характеристик. Выявленный оптимальный технологический режим заключается во введении 68,7 мл воды очищенной во время гранулирования и перемешивания таблеточной смеси в течение 9,9 мин со скоростью вращения лопастной мешалки 200 об/мин. Перечисленные параметры процесса обеспечивают наиболее оптимальные фармацевтико-технологические характеристики таблеток.

Ключевые слова: ГСБ-106, метод поверхностного отклика, трехуровневый план Бокса–Бенкена, прочность таблеток на раздавливание, распадаемость, истираемость

Для цитирования: Тишков С.В., Блынская Е.В., Алексеев К.В., Дорофеев В.Л. Оптимизация процесса влажной грануляции методом поверхностного отклика при получении таблеток ГСБ-106. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):53–62.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-53-62>

Optimization of wet granulation by surface response method in obtaining GSB-106 tablets

Sergey V. Tishkov, Evgenia V. Blynskaya, Konstantin V. Alekseev, Vladimir L. Dorofeev

Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

Contacts: Sergey Valerievich Tishkov tishkov_sv@academpharm.ru

Background. A key component of pharmaceutical development is the optimization and justification of technological processes, since the influence of critical process parameters (KPP) on critical quality indicators (CPC) is one of the dimensions of the design field within which a medicinal product (LP) is created. This study shows the relationship between the conditions of wet granulation and the characteristics of GSB-106 tablets.

Aim. To study the effect of wet granulation PPC on the main parameters of GSB-106 tablets in the development of an optimal technological regime using the Box–Behnken plan.

Materials and methods. Equipment used: high-speed mixer granulator GSL-12 (Etorch, China), granulator with screening function WG-30 (Pharmag, Germany); manual hydraulic press PRG-50 (Russia); strength analyzer TBF 1000 (Copley Scientific, UK); disintegration analyzer SVM 221 (Erweka, Germany); PTF 3DR abrasion analyzer (Pharma Test, Germany). The mathematical planning of the experiment was carried out using the surface response method with a three-level Box–Behnken plan, regression and variance analysis were applied, and multi-criteria optimization using generalized desirability by Derringer–Suich.

Results. To develop the technological process, 15 experiments were conducted in the entire range of varying factors, such as the duration of mixing, the speed of rotation of the blades, and the amount of granulating solution. The following pharmaceutical and technological characteristics were studied: crushing strength and disintegration of tablets at a pressing pressure of 5 kN/m², 10 kN/m², as well as abrasion resistance. Based on the data obtained, regression analysis equations were developed for each studied characteristic, the obtained models were compared by determination coefficients, the statistical significance of the equation terms was evaluated, and regression equations were optimized by getting rid of statistically insignificant equation terms. After constructing a mathematical model with adequate predictive ability, multi-criteria optimization was performed using generalized Derringer–Suich desirability.

Conclusion. Multi-criteria optimization allowed us to determine the most optimal combination of control factors in accordance with the prioritization of the desirability of pharmaceutical and technological characteristics. The identified optimal technological regime consists in adding 68.69 ml of purified water and stirring the tablet mixture for 9.92 minutes at a speed of a paddle mixer for 200 rpm, which provide the most optimal pharmaceutical and technological characteristics of the tablets.

Keywords: GSB-106, surface response method, three-level Box–Behnken plan, tablet crushing strength, disintegration time, friability

For citation: Tishkov S.V., Blynskaya E.V., Alekseev K.V., Dorofeev V.L. Optimization of wet granulation by surface response method in obtaining GSB-106 tablets. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(3):53–62. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-53-62>

Введение

Взаимосвязь и взаимозависимость факторов технологического процесса и фармацевтико-технологических характеристик в концепции «качество путем разработки» (quality by design) выражается через влияние критических параметров процесса (КПП) на критические параметры качества в рамках проектного поля (design space) или, по-другому, пространства проектных параметров. В качестве основного механизма исследования параметров качества и условий технологического процесса, вспомогательных веществ, активных фармацевтических субстанций (АФС) и лекарственного препарата (ЛП) выступает фармацевтическая разработка, описанная в гармонизированном трехстороннем руководстве по качеству ICH Q8, и взаимосвязанный с данной разработкой

процесс управления рисками для качества (ICH Q9) [1, 2]. Одним из наиболее часто используемых фактических прикладных инструментов фармацевтической разработки с учетом управления рисками для качества выступает формальное планирование экспериментов (design of experiments), заключающееся в применении математических методов и моделей для облегчения выявления степени корреляции между факторами и оптимизируемыми характеристиками [3, 4]. Методы математического планирования позволяют сократить количество экспериментов и определить наилучшее сочетание факторов, влияющих на лекарственную форму и фармацевтико-технологические свойства ЛП. Иногда воздействие КПП на характеристики ЛП может осуществляться опосредованно, например условия проведения процесса

грануляции косвенно влияют не только на свойства таблеточной массы, но и на основные фармацевтико-технологические характеристики таблеток [5, 6]. К условиям технологического процесса влажного гранулирования, осуществляемого на высокоскоростном смесителе-грануляторе, которые могут оказать влияние на плотность, прочность, форму гранул, обычно относят тип, количество и размер лопастей смесителя, а также разделителя, конфигурацию смесительной чаши, скорость вращения, продолжительность вращения, объем гранулирующей жидкости в сочетании с факторами состава, т. е. видом и количеством вспомогательных веществ [7, 8]. В частности, некоторые исследователи описывают влияние плотности и прочности гранул на процесс прессования и соответствующие механические характеристики таблеток [9–11]. Степень влияния параметров технологического процесса влажного гранулирования определяется экспериментально с использованием методов планирования экспериментов, среди которых следует выделить метод поверхностного отклика с трехуровневым планом Бокса–Бенкена, подходящий для анализа количественных характеристик. Данный метод позволяет построить теоретические регрессионные модели для влияния переменных на фармацевтико-технологические характеристики, оценить воздействие отдельных факторов и их взаимодействий, а также по построенным регрессионным моделям провести оптимизацию характеристик на всем вариативном пространстве проектных параметров с помощью метода обобщенной желательности по Дерринжеру–Суичу.

С использованием представленных методов математического планирования разработан экспериментальный план оптимизации КПП влажного гранулирования и свойств таблеток с АФС, имеющей шифр ГСБ-106, обладающей антидепрессивной активностью [12].

Цель данного исследования заключается в изучении влияния КПП влажного гранулирования на основные показатели таблеток ГСБ-106 при разработке оптимального технологического режима, используя план Бокса–Бенкена.

Материалы и методы

Материалы

АФС: ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина)) (рис. 1) (ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Россия) [13], лактозы моногидрат (Lactochem Fine Powder, DFE Pharma, Германия), микрокристаллическая целлюлоза (Microcel MC 101, Blanver Farmoquimica Ltd., Бразилия), сополимер поливинилового спирта и полиэтиленгликоля (Kollicoat IR, BASF, Германия), вода

очищенная (ФС.2.2.0020.15, Государственная фармакопея Российской Федерации XV пересмотра), магния стеарат (Ligamed MF-2-V, USP-NF, BP, Ph. Eur., JP, Galmags, Германия).

Используемое оборудование и методики

При процессе приготовления гранул применяли высокоскоростной смеситель-гранулятор GSL-12 (Etorch, Китай), лабораторный гранулятор с функцией просеивания WG-30 (Pharmag, Германия), для получения таблеток использован ручной гидравлический пресс ПРГ-50 (Россия). Определение показателей проведено на следующих приборах и оборудовании: насыпной плотности и плотности после уплотнения – на анализаторе насыпной плотности SVM 221 (ERWEKA, Германия), сыпучести – на тестере определения сыпучести GTB (ERWEKA, Германия), гранулометрического состава – на вибрационном сите с размерами пор 1000, 500, 315, 200, 140, 125 мкм, устойчивости таблеток к раздавливанию – на анализаторе прочности TBF 1000 (Copley Scientific, Великобритания), распадаемости – на анализаторе распадаемости SVM 221 (ERWEKA, Германия), истираемости таблеток – на анализаторе истираемости PTF 3DR (Pharma test, Германия). Расчет коэффициентов Карра и Хауснера производили в соответствии с Фармакопеей ЕАЭС 2.1.9.7.201090007–2019. Результаты представлены в виде среднего со стандартным отклонением ($N = 5$).

Метод получения таблеточной смеси и таблеток

Модельные составы получали, используя высокоскоростной смеситель-гранулятор и лабораторный гранулятор с функцией просеивания. Предварительно в смесительный корпус отвешивали просеянные наполнители, связующие вспомогательные вещества

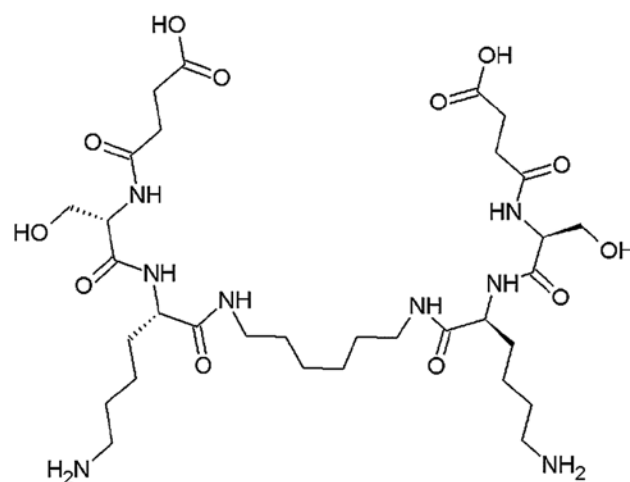


Рис. 1. Структурная формула ГСБ-106

Fig. 1. Structural formula of GSB-106

и приготовленную тритурацию 1:10 (АФС:лактоза). Перемешивали смесь сухих порошков в течение 2 мин при скорости вращения лопастей 200 об/мин. Увлажнение проводили водой очищенной во время работы лопастей и разделителя, скорость вращения лопастей смесителя задавали в соответствии с разработанным планом эксперимента, скорость вращения разделителя составляла 300 об/мин. Продолжительность грануляции также определялась планом эксперимента. После проведения грануляции для дополнительного перераспределения влаги проводили смешивание гранулята в течение 1 мин со скоростью работы лопастей 350 об/мин и скоростью работы чоппера 2880 об/мин, после чего отобранные образцы пробивали через сито с диаметром отверстий 1 мм в лабораторном грануляторе с функцией просеивания. Полученные гранулы высушивали при температуре 45 °С, проводили калибровку высушенных гранул и опудривание образцов. После опудривания таблеточную массу прессовали, используя усилие прессования 5 и 10 кН с помощью двояковыпуклых пуансонов диаметром 6 мм.

Математическое планирование эксперимента и статистический анализ

Для математического планирования эксперимента использовали метод поверхностного отклика с трехуровневым планом Бокса–Бенкена, регрессионным и дисперсионным анализом, а также применяли функцию обобщенной желательности Дерринжера–Суича [14]. Математическое планирование и статистическая оценка результатов выполнены с использованием пакета программного обеспечения Minitab 19 (Minitab Inc., США). Исследования проводили в рандомизированном порядке, для уменьшения экспериментальной ошибки использовали средние значения выборки, состоящей из 5 измерений для каждого отклика.

Результаты и обсуждение

Оптимизацию технологического процесса влажной грануляции на высокоскоростном смесителе-грануляторе осуществляли, используя состав, разработанный в ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий на предыдущих этапах исследований (табл. 1) [15]. Таблеточную массу и таблетки ГСБ-106 получали с применением АФС и вспомогательных веществ, описанных в разделе «Материалы и методы».

Оптимизацию технологического процесса влажного гранулирования реализовывали с помощью трехуровневого плана Бокса–Бенкена, который выступает как разновидность метода поверхностного отклика и позволяет уменьшить количество экспериментов с варьированием факторов в крайних и средних точках диапазона варьирования.

Таблица 1. Состав таблеток ГСБ-106, получаемых методом влажной грануляции

Table 1. Composition of GSB-106 tablets obtained by wet granulation

Наименование компонентов Name of components	Содержание в таблетке, г Content in tablet, g
ГСБ-106 GSB-106	0,001
Микрокристаллическая целлюлоза Microcrystalline cellulose	0,033
Лактозы моногидрат Lactose monohydrate	0,060
Сополимер поливинилового спирта и полиэтиленгликоля Copolymer of polyvinyl alcohol and polyethylene glycol	0,005
Магния стеарат Magnesium stearate	0,001
Масса ядра таблетки Tablet core weight	0,100

В настоящем исследовании изучали КПП, оказывающие существенное влияние на конечные свойства ЛП и отличающиеся простотой внесения изменений в процесс. Исследование влияния геометрических особенностей лопастей мешалки и корпуса смесителя на процесс грануляции не проводили ввиду планируемого трансфера технологии и соответствующего изменения конфигурации оборудования на производственной площадке.

В результате среди факторов, выступающих в качестве основных КПП, выделили:

- фактор *A* — длительность процесса гранулирования (продолжительность перемешивания);
- фактор *B* — количество (объем) гранулирующей жидкости;
- фактор *C* — скорость вращения лопастей смесителя.

Представленные факторы технологического процесса выступали в качестве независимых переменных с крайними точками для фактора *A* от 2 до 10 мин, для фактора *B* (объем жидкости) — 50–100 мл, для скорости вращения лопастей смесителя (фактор *C*) — 200 и 500 об/мин. Фармацевтико-технологические свойства таблеток при математическом планировании рассматривали как зависимые переменные (отклики), изменяющиеся под действием представленных факторов. Матрица эксперимента и уровни варьирования независимых переменных продемонстрированы в табл. 2.

Модельные образцы получали способом, описанным в разделе «Материалы и методы», после чего таблетки, полученные при установленном давлении

Таблица 2. Матрица эксперимента в соответствии с планами Бокса–Бенкена

Table 2. Experimental matrix according to Box–Behnken plans

№	Уровень* Level*			Значение уровня Level value		
	A	B	C	продолжительность перемешивания, мин mixing duration, min	количество раствора, мл amount of solution, ml	скорость мешалки, об/мин stirrer speed, rpm
1	–1	–1	0	2	50	350
2	1	–1	0	10	50	350
3	–1	1	0	2	100	350
4	1	1	0	10	100	350
5	–1	0	–1	2	75	200
6	1	0	–1	10	75	200
7	–1	0	1	2	75	500
8	1	0	1	10	75	500
9	0	–1	–1	6	50	200
10	0	1	–1	6	100	200
11	0	–1	1	6	50	500
12	0	1	1	6	100	500
13	0	0	0	6	75	350
14	0	0	0	6	75	350
15	0	0	0	6	75	350

*Здесь и далее в табл. 4–6: A – продолжительность перемешивания, мин; B – количество раствора, мл; C – скорость мешалки, об/мин.

*Here and below in Table 4–6: A – mixing duration, min; B – amount of solution, ml; C – stirrer speed, rpm.

прессования, оценивали по таким фармацевтико-технологическим показателям, как прочность таблеток на раздавливание, распадаемость и истираемость (табл. 3). Вариации давления прессования использовали для оценки влияния параметров грануляции на характеристики таблеток, полученных при различном давлении прессования. В частности, выдвинута гипотеза о нейтрализации влияния характеристик гранул на свойства таблеток при увеличении давления прессования. Прочность таблеток на истираемость исследовали при усилии прессования 5 кН/м² ввиду достаточности измерений при низком компрессионном давлении.

На I этапе исследования, анализируя результаты фармацевтико-технологических характеристик таблеток (табл. 4), мы рассчитывали уравнения регрессии методом наименьших квадратов для каждой зависимой переменной. Степень адекватности полученных математических моделей экспериментальным данным выражали в виде коэффициентов детерминации и скорректированных коэффициентов детер-

минации, предсказательную способность полученных моделей – с помощью прогностического коэффициента детерминации. Обычный коэффициент детерминации показывает долю объясненной дисперсии в экспериментальной выборке для построенной математической модели, скорректированный коэффициент детерминации использует поправку на количество членов в модели, а прогностический – обозначает то, насколько модель «переобучена», оценивает обобщающую способность и позволяет выявить модель с наилучшей прогностической способностью.

Прогностические коэффициенты детерминации (см. табл. 4) при сравнении с другими показателями качества аналитических выражений зависимости в большинстве уравнений имеют существенные отличия, что говорит о «переобучении» данных моделей. Для преодоления данных эффектов необходимо скорректировать уравнения до достижения наибольшей прогностической способности, оценивая статистическую значимость каждого члена уравнений.

Таблица 3. Фармацевтико-технологические характеристики таблеток, полученных с использованием модельных технологических режимов, и условные обозначения

Table 3. Pharmaceutical and technological characteristics of tablets obtained using model technological regimes

№	Параметр Parameter				
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
1	38,49 ± 1,54	46 ± 0,73	68,4 ± 2,02	128,7 ± 2,05	99,7 ± 2,71
2	29,83 ± 1,23	42,41 ± 2,32	42 ± 2,29	94,6 ± 4,31	99,66 ± 3,26
3	55,78 ± 1,82	70,25 ± 2,89	171 ± 2,72	564 ± 22,56	99,97 ± 4,16
4	42,1 ± 0,67	54,86 ± 1,79	77 ± 2,27	177 ± 9,66	99,71 ± 4,55
5	57,06 ± 3,12	70,93 ± 3,23	189 ± 5,14	592 ± 24,63	99,97 ± 1,59
6	45,92 ± 1,79	55,02 ± 1,62	79,6 ± 3,28	176,1 ± 4,79	99,73 ± 3,88
7	47,43 ± 1,4	58,35 ± 1,72	90 ± 2,83	252,4 ± 9,82	99,85 ± 2,95
8	30,99 ± 0,97	45,75 ± 1,71	46,6 ± 1,74	98,7 ± 2,91	99,7 ± 4,55
9	49,69 ± 1,85	61,82 ± 1,94	98,6 ± 3,22	364,3 ± 9,91	99,86 ± 2,95
10	59,9 ± 1,55	76,52 ± 2,98	210,4 ± 8,42	637 ± 20,83	99,98 ± 2,72
11	26,17 ± 0,71	40,02 ± 1,83	23,2 ± 1,06	72,4 ± 2,14	99,57 ± 3,98
12	54,45 ± 2,48	69,33 ± 1,89	164 ± 6,82	525 ± 14,28	99,91 ± 4,12
13	53,08 ± 2,21	67,64 ± 2,71	125 ± 4,86	441,6 ± 18,19	99,8 ± 3,72
14	53,19 ± 2,57	68,21 ± 1,86	129 ± 5,88	464 ± 17,31	99,81 ± 5,45
15	54,08 ± 2,02	69,17 ± 2,88	135 ± 3,67	513 ± 23,39	99,81 ± 2,71

Примечание. Здесь и далее в табл. 4–7: $Y_1(5)$, $Y_2(10)$ – прочность, Н, при давлении, кН/м²; $Y_3(5)$, $Y_4(10)$ – распадаемость, с, при давлении, кН/м²; Y_5 – истираемость, %.

Note. Here and further in Tables 4–7: $Y_1(5)$, $Y_2(10)$ – strength at pressure, N, kN/m²; $Y_3(5)$, $Y_4(10)$ – disintegration, s, at pressure, N, kN/m²; Y_5 – friability, %.

В табл. 5 представлены коэффициенты Стьюдента и p -значения уравнений регрессий, которые свидетельствуют о статистически значимом влиянии факторов, их взаимодействий и квадратичных членов в данной модели. Фактор инфляции дисперсии для всех математических моделей показывает значения, либо равные 1, либо находящиеся в интервале от 1 до 5 (для взаимодействий факторов), что указывает на отсутствие мультиколлинеарности или на умеренную корреляцию, которая считается допустимой, что говорит о приемлемости предикторов (факторов) по данному параметру.

При анализе коэффициентов Стьюдента и p -значений (см. табл. 5) выявлены факторы, оказывающие статистически значимое влияние на параметры оптимизации в данной модели при уровне значимости $\alpha = 0,05$, после чего оставляли значимые факторы в описании аналитического выражения зависимости и корректировали уравнения. Полученные оптимизированные уравнения регрессии с оценкой их соот-

ветствия экспериментальным данным и прогностической способности показаны в табл. 6. Кроме того, необходимо выделить, что в представленных уравнениях статистически значимое влияние оказывали все использованные в данном уравнении факторы, также для большинства характеристик квадрата фактора A , а другие члены уравнений показали статистическую значимость только для некоторых регрессий. Следует отметить тот факт, что оптимизированные уравнения регрессии (см. табл. 6) при увеличении давления прессования отличаются количеством членов: так эффекты взаимодействий проявляются в большей степени при увеличении давления прессования.

Прогностическая способность оптимизированных уравнений существенно увеличилась при незначительном снижении описательной способности уже имеющихся данных, что позволяет с большей точностью применить многокритериальную оптимизацию, для агрегирования разнородных данных с помощью обобщенной желательности по Дерринжеру–Суичу.

Таблица 4. Регрессионные уравнения для фармацевтико-технологических характеристик таблеток ГСБ-106 и меры детерминации, %
Table 4. Regression equations for pharmaceutical and technological characteristics of GSB-106 tablets and measures of determination, %

Уравнение регрессии Regression equation	Коэффициент детерминации, R ² Determination coefficient, R ²	Скорректированный коэффициент детерминации, R ² Adjusted of determination coefficient, R ²	Прогнос- тический R ² Predicted R ²
$Y_1, H = 9,0 + 5,44 \times A + 1,158 \times B - 0,089 \times C - 0,4405 \times A_2 - 0,00776 \times B_2 - 0,000047 \times C_2 - 0,01254 \times A \times B - 0,00221 \times A \times C + 0,001205 \times B \times C$	98,98	97,15	84,2
$Y_2, H = 1,5 + 7,51 \times A + 1,506 \times B - 0,0881 \times C - 0,6053 \times A_2 - 0,00844 \times B_2 - 0,000051 \times C_2 - 0,0295 \times A \times B + 0,00138 \times A \times C + 0,000973 \times B \times C$	98,69	96,34	79,9
$Y_3, c = 9 + 18,1 \times A + 4,37 \times B - 0,616 \times C - 1,963 \times A_2 - 0,0139 \times B_2 + 0,000135 \times C_2 - 0,169 \times A \times B + 0,0275 \times A \times C + 0,00193 \times B \times C$	95,86	88,40	76,77
$Y_4, c = -414 + 128,8 \times A + 20,74 \times B + 1,703 \times C - 10,99 \times A_2 - 0,0895 \times B_2 - 0,00077 \times C_2 - 0,882 \times A \times B - 0,1092 \times A \times C - 0,01192 \times B \times C$	98,16	94,84	32,84
$Y_5, \% = 100,012 + 0,0306 \times A + 0,00557 \times B - 0,00293 \times C - 0,00201 \times A_2 - 0,000023 \times B_2 + 0,000002 \times C_2 - 0,00055 \times A \times B + 0,000038 \times A \times C + 0,000015 \times B \times C$	95,78	88,17	35,3

Таблица 5. Т-критерий Стьюдента и р-значение для членов регрессионного уравнения
Table 5. Student's t-test and the p-value for the terms of the regression equation

Предикторы Terms	Т-критерий Стьюдента Student's t-test					p				
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
A	-9,73	-7,42	-5,02	-7,53	-5,74	<0,000	0,001	0,004	0,001	0,002
B	13,27	12,6	7,18	9,44	6,49	<0,000	<0,000	0,001	<0,000	0,001
C	-10,44	-7,94	-4,67	-6,24	-4,24	<0,000	0,001	0,005	0,002	0,008
A × A	-7,47	-8,22	-3,14	-7,26	-1,45	0,001	<0,000	0,026	0,001	0,207
B × B	-5,14	-4,48	-0,87	-2,31	-0,66	0,004	0,007	0,426	0,069	0,539
C × C	-1,11	-0,97	0,3	-0,71	1,71	0,316	0,376	0,773	0,509	0,147
A × B	-1,38	-2,61	-1,76	-3,79	-2,59	0,225	0,048	0,139	0,013	0,049
A × C	-1,46	0,73	1,72	2,82	1,06	0,203	0,497	0,147	0,037	0,338
B × C	4,98	3,22	0,75	1,93	2,59	0,004	0,023	0,485	0,111	0,049

Данный метод позволяет установить весовые коэффициенты, определяющие форму графика желательности и коэффициенты значимости (важность фактора), отраженные в табл. 7.

Ранжирование показателей важности (см. табл. 7) во время многокритериальной оптимизации проводили по 10-балльной шкале, где наибольшие

оценки присваивали показателям распадаемости, вследствие критичности показанной характеристики для разработанного состава, на втором месте по значимости находились прочностные характеристики. Большее предпочтение отдавали значениям, полученным при низком давлении прессования и соответственно им присваивали более высокие баллы,

Таблица 6. Оптимизированные регрессионные уравнения и меры детерминации, %

Table 6. Optimized regression equations and measures of determination, %

Уравнение регрессии Regression equation	Коэффициент детерминации, R ² Determination coefficient, R ²	Скорректированный коэффициент детерминации, R ² Adjusted of determination coefficient, R ²	Прогнос- тический R ² Predicted R ²
$Y_1, H = 25,3 + 3,666 \times A + 1,063 \times B - 0,1350 \times C - 0,4355 \times A_2 - 0,00763 \times B_2 + 0,001205 \times B \times C$	97,90	96,32	90,17
$Y_2, H = 5,1 + 7,93 \times A + 1,484 \times B - 0,1154 \times C - 0,5998 \times A_2 - 0,00830 \times B_2 - 0,0295 \times A \times B + 0,000973 \times B \times C$	98,30	96,61	88,08
$Y_3, c = 35,6 + 14,72 \times A + 1,951 \times B - 0,2115 \times C - 1,938 \times A_2$	89,65	85,51	73,36
$Y_4, c = -161 + 124,9 \times A + 11,51 \times B - 1,340 \times C - 10,66 \times A_2 - 0,882 \times A \times B + 0,1092 \times A \times C$	94,71	90,74	81,14
$Y_5, \% = 99,619 + 0,0066 \times A + 0,00720 \times B - 0,000650 \times C - 0,000550 \times A \times B + 0,000038 \times A \times C$	85,12	76,86	49,62

Таблица 7. Ранжирование по важности критических показателей качества лекарственного препарата и целевых значений фармацевтико-технологических характеристик

Table 7. Ranking according to the importance of medicinal product critical quality attributes and target values of pharmaceutical and technological characteristics

Параметр оптимизации Optimization parameter	Цель Goal	Наименьшее значение Less value	Целевое значение Target value	Наибольшее значение Highest value	Вес фактора Weight of factor	Важность фактора Importance of the factor
Y_1, N Y_1, N	Максимум Maximum	26,1660	59,8976	59,8976	0,9	8
Y_2, H Y_2, N	Максимум Maximum	40,0232	76,5184	76,5184	0,9	9
Y_3, c Y_3, s	Минимум Minimum	23,2000	23,2000	210,400	1	10
Y_4, c Y_4, s	Минимум Minimum	72,4000	72,4000	637,000	1	9
$Y_5, \%$	Минимум Minimum	99,5700	99,5700	99,980	0,5	5

наименьшие балльные оценки получила характеристика истираемости, вследствие нахождения всех полученных показателей в удовлетворительной области и более низкой прогностической способности для нее. По такому же принципу были расставлены весовые характеристики, где показатели ниже 1 обозначали уменьшение жесткости требований к фармацевтико-технологическим показателям. В соответствии с данными коэффициентами были рассчитаны и построены графики частных желательностей (рис. 2) по каждому оптимизируемому параметру и обобщенная

желательность, выраженная через среднее геометрическое частных желательностей с учетом весовых характеристик.

На рис. 2 показаны рассчитанные значения, частные и обобщенная желательности, определенные как наиболее оптимальные исходя из приоритетов, установленных во время исследования. В результате многокритериальной оптимизации выявлен наиболее подходящий режим влажного гранулирования, который включает добавление 68,69 мл увлажняющего раствора и перемешивание в течение 9,92 мин, т.е. 9 мин 54 с

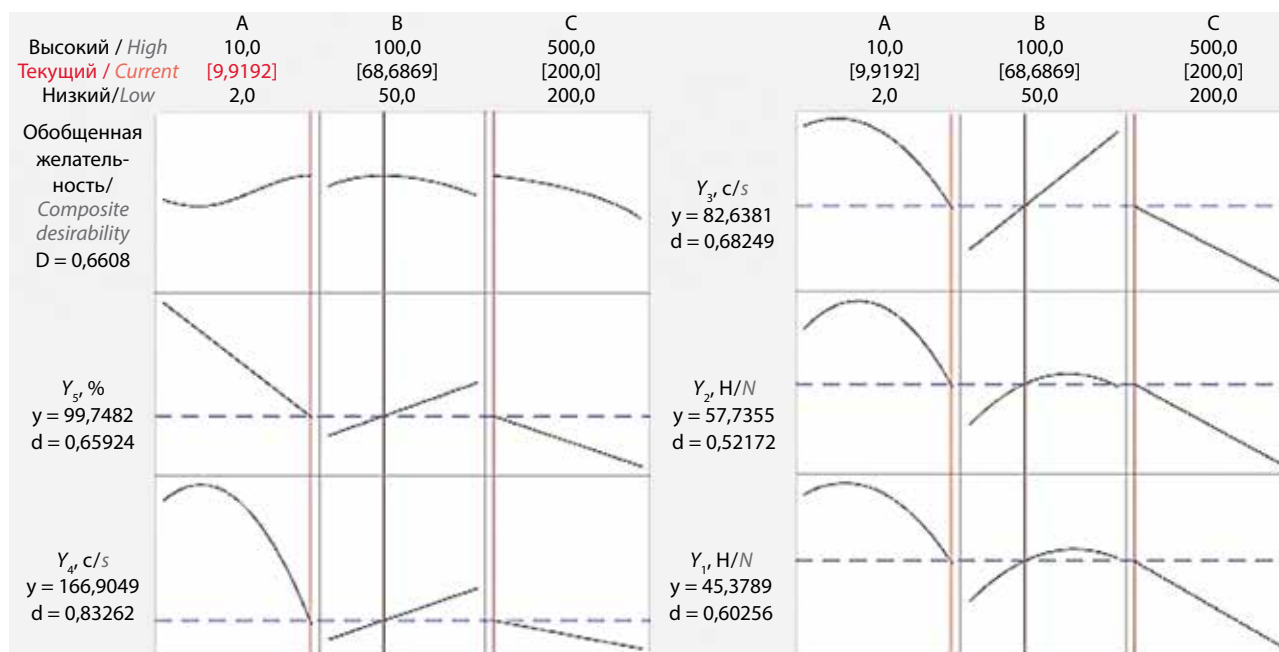


Рис. 2. Графики частных и обобщенной желательностей оптимизируемых параметров

Fig. 2. Graphs of individual and overall desirability of optimized parameters

со скоростью вращения лопастной мешалки 200 об/мин, которые обеспечивают наиболее оптимальные фармацевтико-технологические характеристики таблеток. Однако данные характеристики для удобства технологического процесса можно округлить.

Закключение

Метод поверхностного отклика, выражающийся в применении плана Бокса–Бенкена, позволил построить математическую модель регрессии через квадратичные уравнения, которые были оптимизированы посредством анализа дисперсий экспериментальных данных и сравнения их с полученными моделями с помощью t -критерия Стьюдента.

Оптимизация регрессионных уравнений, заключающаяся в удалении из моделей членов с низкой статистической значимостью, позволила повысить их прогностическую ценность, избавиться от часто встречающейся проблемы «переобучения» и использовать аналитические выражения зависимости для многокритериальной оптимизации. Для агрегирования данных в единый безразмерный показатель использовали многокритериальную оптимизацию с помощью функции обобщенной желательности Дерринжера–Суича. Возможность «гибкого» изменения коэффициентов веса и значимости обеспечили более эффективный учет вариабельности параметров и критериев качества регрессии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. ICH Q8. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva, 2005. P. 19.
2. Quality risk management (ICH Q9). EMA/INS/GMP/79766/2011. URL: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002873.pdf.
3. Тишков С.В., Блынская Е.В., Алексеев К.В. и др. Использование метода SeDeM-ODT для разработки таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):34–46. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-34-46
4. Тишков С.В., Блынская Е.В., Алексеев К.В. и др. Оптимизация технологии прессования таблеток ГК-2-гексаметиленамида бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина), диспергируемых в полости рта, с применением математических моделей хеккеля и кавакита. Химико-фармацевтический журнал 2021;55(12):38–42. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-12-38-42
5. Tishkov S.V., Blynskaja E.V., Alekseev K.V. et al. Using the SeDeM-ODT method for the development of GK-2 tablets dispersed in the oral cavity. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):34–46. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-34-46

- Tishkov S.V., Blynskaja E.V., Alekseev K.V. et al. Optimization of the technology of pressing tablets of GK-2-hexamethyleneamide bis-(N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine), dispersible in the oral cavity, using mathematical models of Heckel and Kawakita. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal* 2021;55(12):38–42. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-12-38-42
5. Holm P., Schaefer T., Larsen C. End-point detection in a wet granulation process. *Pharm Dev Technol* 2001;6(2):181–92. DOI: 10.1081/pdt-100000739
 6. Rajniak P., Mancinelli C., Chern R.T. et al. Experimental study of wet granulation in fluidized bed: impact of the binder properties on the granule morphology. *Int J Pharm* 2007;334(1-2):92–102. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.10.040
 7. Iveson S.M., Litster J.D., Hapgood K. et al. Nucleation, growth and breakage phenomena in agitated wet granulation processes: a review. *Powder Technol* 2001;117(1-2):3–39. DOI: 10.1016/S0032-5910(01)00313-8
 8. Iveson S.M., Wauters P.A., Forrest S. et al. Growth regime map for liquid-bound granules: further development and experimental validation. *Powder Technol* 2001;117(1-2):83–97. DOI: 10.1016/S0032-5910(01)00317-5
 9. De Simone V., Dalmoro A., Lamberti G. et al. Central composite design in HPMC granulation and correlations between product properties and process parameters. *New J Chem* 2017;41(14):6504–13. DOI: 10.1039/C7NJ01280B
 10. Chitu T.M., Oulahna D., Hemati M. Wet granulation in laboratory scale high shear mixers: Effect of binder properties. *Powder Technol* 2011;206(1-2):25–33. DOI: 10.1016/j.powtec.2010.07.012
 11. Litster J.D., Hapgood K.P., Michaels J.N. et al. Liquid distribution in wet granulation: dimensionless spray flux. *Powder Technol* 2001;114(1-3):32–9. DOI: 10.1016/S0032-5910(00)00259-X
 12. Блынская Е.В., Буюева В.В., Алексеев К.В. и др. Оценка размера и формы гранул ГСБ-106, полученных влажным гранулированием, с использованием метода анализа изображений. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств* 2021;2(32):47–53. DOI: 10.34907/JPQAI.2021.71.82.007
 - Blynskaja E.V., Bueva V.V., Alekseev K.V. et al. Evaluation of the size and shape of GSB-106 granules obtained by wet granulation using image analysis method. *Voprosy obespechenija kachestva lekarstvennyh sredstv = Journal of Pharmaceuticals Quality Assurance Issue* 2021;2(32):47–53. (In Russ.). DOI: 10.34907/JPQAI.2021.71.82.007
 13. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А. и др. Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106. *Acta Naturae* 2013;4(19):116–20.
 - Seredenin S.B., Voronina T.A., Gudasheva T.A. et al. Antidepressant effect of the original low molecular weight BDNF mimetic, dimeric dipeptide GSB-106. *Acta Naturae (russkojazychnaja versija)* 2013;4(19):116–20. (In Russ.).
 14. Beg S., Akhter S. Box–Behnken designs and their applications in pharmaceutical product development. *Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development. Vol. I: Basics and Fundamental Principles*. Springer, 2021. P. 77–85.
 15. Блынская Е.В., Буюева В.В., Алексеев К.В. и др. Функция желательности Харрингтона в разработке состава таблеток ГСБ-106. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств* 2019;26(4):57–65.
 - Blynskaja E.V., Bueva V.V., Alekseev K.V. et al. Harrington's Desirability Function in the Development of the GSB-106 Tablet Composition. *Voprosy obespechenija kachestva lekarstvennyh sredstv = Journal of Pharmaceuticals Quality Assurance Issue* 2019;26(4):57–65. (In Russ.).

Вклад авторов

С.В. Тишков: получение материала исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
Е.В. Блынская, К.В. Алексеев: разработка дизайна исследования, обобщение материала исследования;
В.Л. Дорофеев: анализ материала, редактирование текста рукописи.

Author's contributions

S.V. Tishkov: obtaining research material, analysis of the data obtained, writing the text of the manuscript;
E.V. Blynskaya, K.V. Alekseev: development of research design, generalization of research material;
V.L. Dorofeev: analysis of the material, editing the text of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Тишков / S.V. Tishkov: <https://orcid.org/0000-0002-8321-6952>
Е.В. Блынская / E.V. Blynskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9494-1332>
К.В. Алексеев / K.V. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0003-3506-9051>
В.Л. Дорофеев / V.L. Dorofeev: <https://orcid.org/0009-0004-3584-3742>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 02.09.2024. Принята к публикации: 02.07.2025. Опубликовано онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 02.09.2024. Accepted for publication: 02.07.2025. Published online: 25.09.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-63-69>

Анемический синдром у больных раком прямой кишки

В.Н. Блиндарь, И.А. Климанов*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24***Контакты:** Валентина Николаевна Блиндарь bld51@list.ru

Введение. Известно, что у онкологических больных при диагностике заболевания часто выявляется анемический синдром (АС). Последний наряду с размером опухоли и стадией заболевания рассматривают как независимый фактор прогноза, влияющий на выживаемость.

Цель исследования – анализ гематологических параметров периферической крови и показателей феррокинетики для уточнения роли гепсидина-25 (ГП-25), интерлейкина 6 (ИЛ-6) в ранней и дифференциальной диагностике вариантов АС у больных раком прямой кишки (РПК).

Материалы и методы. Исследование проведено у 32 больных РПК до лечения. Гематологические параметры периферической крови исследовали на анализаторе Sysmex XE-2100 (Япония). Концентрации ферритина, ГП-25, ИЛ-6, эритропоэтина определяли в плазме крови с помощью иммуноферментного метода.

Результаты. Почти у 1/2 (47 %) больных РПК выявлен АС в 2 вариантах: железодефицитная анемия и функциональный дефицит железа (ФДЖ). Для всех вариантов были характерны микроцитоз, гипохромия эритроцитов и ретикулоцитов, что свидетельствовало о железодефицитном эритропоэзе. Однако у больных с III–IV стадией заболевания и ФДЖ концентрация ферритина, ГП-25, ИЛ-6, количество фрагментов эритроцитов оказалась статистически значимо выше, а уровни эритроцитов, гемоглобина, гематокрита ниже, чем у больных с железодефицитной анемией. Это указывало на длительный процесс формирования АС или анемию хронического заболевания с ФДЖ. Отклонения от референсного значения уровня ГП-25 и ферритина выявлены не только у больных с АС, но и у отдельных больных без гематологических признаков анемии, что не исключало латентной стадии АС. Дефицит эритропоэтина относительно степени тяжести АС установлен во всех вариантах.

Заключение. Исследование было малочисленным, что не позволяет сделать однозначный вывод о роли ГП-25 и ИЛ-6 в патогенезе варианта АС с ФДЖ у больных РПК и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: анемический синдром, ферритин, гепсидин-25, интерлейкин 6, эритропоэтин

Для цитирования: Блиндарь В.Н., Климанов И.А. Анемический синдром у больных раком прямой кишки. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):63–9.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-63-69>

Anemic syndrome in patients with rectal cancer

Valentina N. Blindar, Igor A. Klimanov*N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia***Contacts:** Valentina Nikolaevna Blindar bld51@list.ru

Background. It is known that anemic syndrome (AS) is often detected in cancer patients during disease diagnosis. AS, along with tumor size and disease stage, is considered as an independent prognostic factor affecting survival.

Aim. To analyze hematological parameters of peripheral blood and ferrokinetic parameters to clarify the role of hepcidin (GP-25), interleukin 6 (IL-6) in early and differential diagnostics of AS variants in patients with rectal cancer (RC).

Materials and methods. The study was conducted in 32 patients with RC before treatment. Hematological parameters of peripheral blood were studied on a Sysmex XE-2100 analyzer (Japan). Determination of the concentration of ferritin, GP-25, IL-6, erythropoietin was performed in blood plasma using ELISA.

Results. Almost half (47 %) of the patients with RC had AS in two variants: iron deficiency anemia and functional iron deficiency (FID). All variants were characterized by microcytosis, hypochromia of erythrocytes and reticulocytes,

which indicated iron deficiency erythropoiesis. However, in patients with stages III–IV of the disease and with FID, the concentration of ferritin, GP-25, IL-6, the number of erythrocyte fragmentocytes was statistically significantly higher, and the levels of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit were lower than in patients with iron deficiency anemia. This indicated a long-term process of AS formation or anemia of chronic disease with FID. Deviations from the reference value of GP-25 and ferritin levels were detected not only in patients with AS, but also in individual patients without hematological signs of anemia, which did not exclude the latent stage of AS. Erythropoietin deficiency relative to the severity of AS was established in all variants.

Conclusion. The study was small in number, which does not allow us to draw an unambiguous conclusion about the role of GP-25 and IL-6 in the pathogenesis of the AS variant with FJ in patients with RC and requires further study.

Keywords: anemic syndrome, ferritin, hepcidin-25, interleukin 6, erythropoietin

For citation: Blindar V.N., Klimanov I.A. Anemic syndrome in patients with rectal cancer. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(3):63–9. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-63-69>

Введение

Известно, что колоректальный рак в настоящее время занимает 3-е место по заболеваемости и 2-е место по смертности от рака в мире. За последнее десятилетие наметилась тенденция к изменению структуры онкологических заболеваний [1, 2]. На фоне стабилизации, снижения заболеваемости раком желудка отмечается заметный рост случаев колоректального рака, в частности рака прямой кишки (РПК) [1–4]. Необходимо подчеркнуть, что у большинства больных РПК еще до начала лечения нередко выявляются изменения в системе кроветворения, а именно развивается анемический синдром (АС). В отличие от большинства неспецифических симптомов анемия является лабораторным показателем, который легко измерить и сравнить у пациентов по всему миру. Высокая распространенность анемии среди онкологических больных — чрезвычайно актуальная проблема медицины, причем АС часто служит предиктором скрининга ранней диагностики рака [5]. Наряду с размером опухоли и стадией заболевания АС рассматривают как независимый фактор прогноза, влияющий на выживаемость [5]. Доказано, что нормализация уровня гемоглобина (HGB) приводит к увеличению как общей выживаемости, так и выживаемости без прогрессирования заболевания [4, 5].

Цель исследования — анализ гематологических параметров периферической крови и показателей феррокинетики для уточнения роли ГП-25, ИЛ-6 в ранней и дифференциальной диагностике вариантов АС у больных РПК.

Материалы и методы

Исследование выполнено у 32 больных РПК с морфологически подтвержденным диагнозом до операции при случайной выборке, которые поступили на лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Из них 15 мужчин и 17 женщин в возрасте от 31 до 78 лет ($63,5 \pm 1,7$ года). Так, стадия II выявлена у 4 пациентов, IIIA — у 9, IIIB и IIIC — у 11, IV — у 8 больных. Контрольная группа состояла из 34 сотрудников

центра соответствующего возраста и пола, без онкопатологии и АС.

Исследование образцов периферической крови проводили методом проточной цитофлуориметрии на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XE-2100 (Sysmex, Япония). Из показателей красной крови, помимо числа эритроцитов (RBC) и содержания в них HGB, оценивали следующие расчетные показатели: средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание HGB в эритроците (MCH) и ретикулоците (RET-HE), гематокрит (HCT), коэффициент вариации ширины распределения эритроцитов по объему (RDW-CV), количество эритроцитов с низким объемом (MICRO) и гипохромией (HYPO), количество фрагментов эритроцитов (FRG). Методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли содержание ферритина (ФР), интерлейкина 6 (ИЛ-6) в плазме крови с использованием реагентов «Вектор-Бест» (Россия), уровня эндогенного эритропоэтина (ЭПО) (Biomerica, США), гепсидина-25 (ГП-25) (Cloud-Clone Corp., США). Результаты оценивали на спектрофотометре Multiskan Spectrum (Финляндия). Подсчет лейкоцитарной формулы и детальный анализ морфологии эритроцитов осуществляли с помощью микроскопа Leica (Германия). Статистическую обработку полученных данных (определение среднего значения, среднего квадратического отклонения или стандартной ошибки, статистической значимости результатов, границы доверительных интервалов в диаграммах) проводили с использованием программных пакетов MS Excel Biostat (Microsoft, США). Для оценки достоверности результатов применяли *t*-критерий Стьюдента, при непараметрическом распределении — критерий Уилкоксона—Манна—Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали менее или равным 0,05.

Результаты

Критериями диагностики АС считали: у мужчин — уровень HGB <130 г/л, гематокрит (HCT) <39 %;

у женщин — уровень HGB <120 г/л, HCT <36 %. На основании гематологических показателей крови больные РПК были разделены на 2 группы: 1-я группа — без АС ($n = 17$; 53 %), 2-я — с АС ($n = 15$; 47 %). У больных без АС концентрация большинства анализируемых показателей была в пределах референсных значений, за исключением уровней ФР и ГП-25 (рис. 1–4).

Концентрация ФР значительно варьировала в этой группе, диапазон значений колебался от относительно низких до высоких показателей. Невысокая концентрация ФР (<30 нг/мл) в 1-й группе выявлена только у 1 больного, что может подтверждать истощение запасов железа и латентную стадию железодефицитной анемии (ЖДА). Об этом свидетельствовали и низкие показатели ГП-25 (<100 пг/мл) у этого пациента. Следует отметить, что более чем у 1/2 (9 пациентов, или 53 %) больных РПК без АС выявили высокую концентрацию ФР (187–403 нг/мл), у остальных 8 (47 %) пациентов показатели были в пределах нормы

(44,2–109 нг/мл). Такая же ситуация прослеживалась при анализе данных по ГП-25, отмечены значительные колебания показателей (99–219 пг/мл). Однако в среднем по группе при непараметрическом анализе результатов как для ФР ($148 \pm 18,1$ нг/мл), так и для ГП-25 ($166 \pm 28,1$ пг/мл) выявили статистически значимое повышение концентрации по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Уровень ЭПО у больных РПК без АС находился в пределах референсных значений (4,3–32,9 мЕ/мл), среднее значение составило $26,6 \pm 6,9$ мЕ/мл (см. рис. 3).

Показатели концентрации HGB у участников 2-й группы с АС колебались от 64 до 121 г/л и в среднем по группе составили $104 \pm 4,3$ г/л. У всех пациентов с РПК преобладала анемия I и II степени тяжести с микроцитозом (MCV <80 фл, MICRO >5 %) и гипохромией (MCH <28 пг, HYPO >5 %) эритроцитов и ретикулоцитов (RET-HE <28 пг) с относительно сохраненным количеством RBC и низким

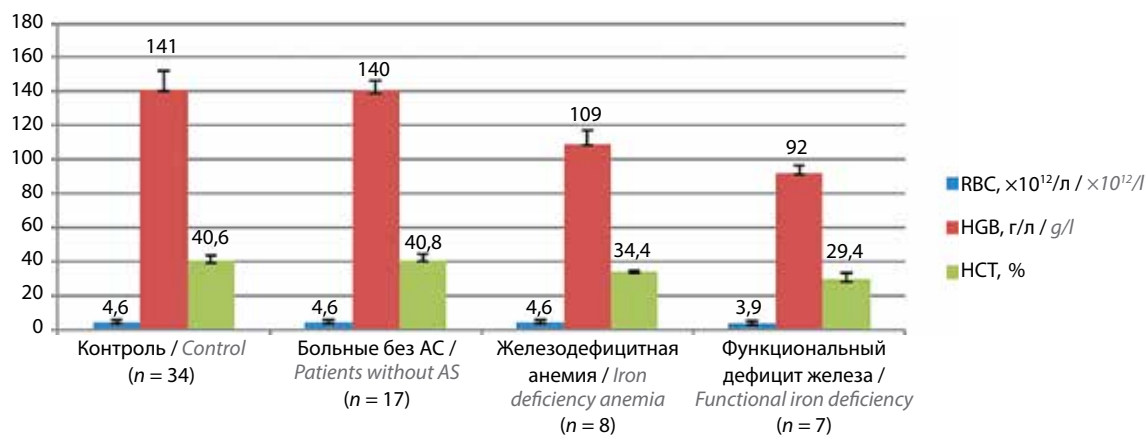


Рис. 1. Показатели уровня эритроцитов (RBC), гемоглобина (HGB) и гематокрита (HCT) у больных раком прямой кишки с разными вариантами анемического синдрома (АС)

Fig. 1. Indicators of the level of red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB) and hematocrit (HCT) in patients with rectal cancer with different types of anemic syndrome (AS)

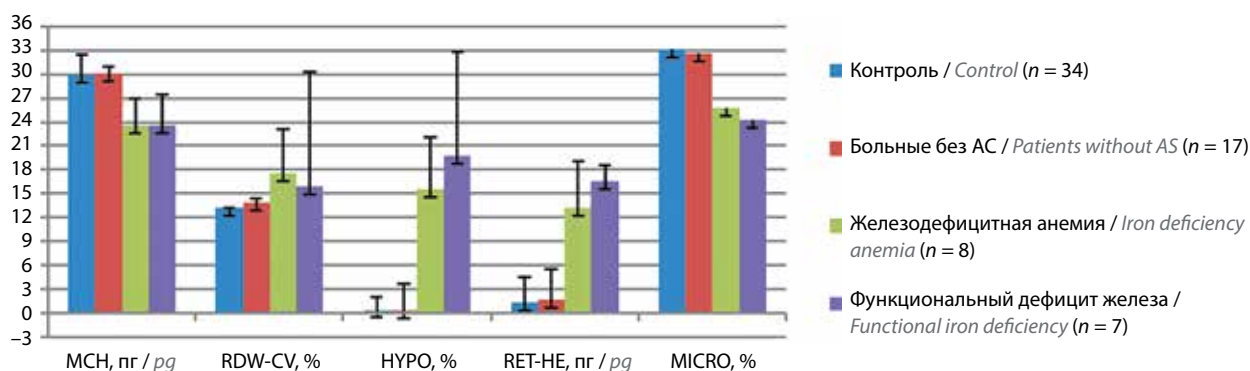


Рис. 2. Показатели среднего содержания гемоглобина в эритроцитах (MCH) и ретикулоцитах (RET-HE), коэффициента вариации ширины распределения эритроцитов по объему (RDW-CV), числа гипохромных (HYPO) и микроцитарных форм (MICRO) эритроцитов у больных раком прямой кишки с разными вариантами анемического синдрома (АС)

Fig. 2. Indicators of the mean corpuscular hemoglobin in erythrocytes (MCH) and reticulocytes (RET-HE), the red cell distribution width coefficient of variation (RDW-CV), the number of red blood cells with hypochromia (HYPO) and microcytic (MICRO) forms of erythrocytes in patients with rectal cancer with different variants of anemic syndrome (AS)

НСТ (<36 %), показатель RDW-CV был выше нормы (>15 %). Более чем у 1/2 больных с АС (8 пациентов, или 53,3 %) диагностировали классическую ЖДА. При микроскопии окрашенного препарата крови обнаружена значительная популяция микроцитарных и гипохромных эритроцитов, выявлены единичные пойкилоциты (рис. 5). Отмечено снижение и концентрации ФР, ГП-25 (см. рис. 3), что свидетельствовало о дефиците железа. Концентрация ИЛ-6 у больных

с ЖДА не превышала показатели контроля и пациентов без АС (см. рис. 3). ЖДА встречалась только у больных со II и IIIA стадиями заболевания РПК.

У 7 (46,7 %) больных с АС выявили функциональный дефицит железа (ФДЖ), который, в отличие от ЖДА, характеризовался высокой концентрацией ФР, ГП-25, ИЛ-6 и более низкими значениями RBC, HGB, НСТ ($p < 0,001$) (см. рис. 1, 3). Качественные характеристики RBC: MCH, RDW-CV, HYP0, MICRO,

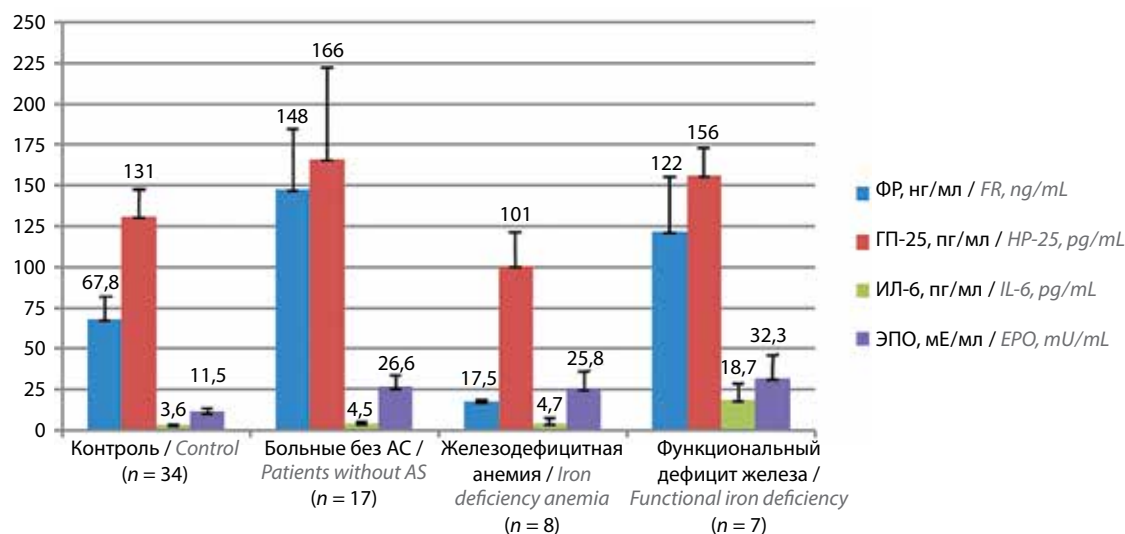


Рис. 3. Показатели концентрации ферритина (ФР), гепсидина-25 (ГП-25), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и эритропоэтина (ЭПО) в плазме крови у больных раком прямой кишки с разными вариантами анемического синдрома (АС)

Fig. 3. Concentrations of ferritin (FR), hepcidin-25 (HP-25), interleukin-6 (IL-6) and erythropoietin (EPO) in blood plasma in patients with rectal cancer with different types of anemic syndrome (AS)

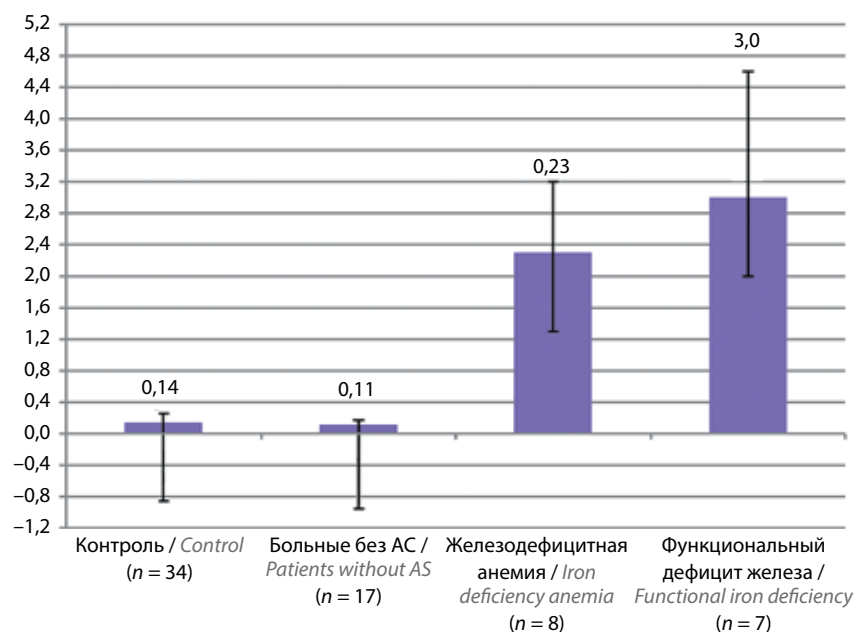


Рис. 4. Показатели концентрации фрагментоцитов эритроцитов (%) у больных раком прямой кишки в зависимости от варианта анемического синдрома (АС)

Fig. 4. Indicators of the concentration of erythrocyte fragmentocytes (%) in patients with rectal cancer, depending on the type of anemic syndrome (AS)

RET-HE — у больных с ЖДА и ФДЖ были значительно ниже ($p < 0,01$), чем в контроле и у пациентов без АС (см. рис. 2). У больных с ЖДА и ФДЖ выявлена значительная концентрация FRG ($p < 0,01$) по сравнению не только с показателями контрольной группы, но и с таковыми у больных без диагностированного АС (см. рис. 4). При этом у больных с ФДЖ этот показатель был статистически значимо выше, чем у больных с ЖДА ($p < 0,01$).

Анализ полученных данных выявил адекватный уровень ЭПО только у 1 больного РПК с ЖДА. У остальных пациентов ($n = 16$) как с ЖДА, так и с ФДЖ уровень ЭПО был относительно низким (см. рис. 3).

Обсуждение

У онкологических больных АС — частое осложнение. Раннее выявление и лечение АС признано важной составляющей онкологической терапии. АС также статистически значимо связан со снижением эффективности химиотерапии и лучевой терапии с последующим негативным влиянием на прогноз больных [6–8]. Известно, что АС, сопровождающий хронические воспалительные процессы, в том числе и у онкологических больных, относится к так называемой анемии хронических заболеваний (АХЗ). Согласно современным представлениям патогенез АХЗ мультифакторный, и в его основе лежит иммуноопосредованный механизм. Полагают, что важным фактором иммунопатогенеза АХЗ является дисрегуляция нормального цитокинового баланса с увеличением продукции провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-6. Экспериментально доказано, что гиперпродукция ИЛ-6 может стимулировать синтез в печени основного универсального регулятора метаболизма железа белка ГП-25. Повышенный уровень ГП-25 приводит к недостаточному поступлению железа и ФДЖ из-за интернализации ферропортина, наиболее важного трансмембранного канала для экспорта железа из энтероцитов и макрофагов в кровотоки. Эритропоэз при этом неадекватно обеспечивается железом [9–11].

В нашем исследовании АС с железодефицитным эритропоэзом диагностирован почти у 1/2 больных РПК в 2 вариантах: ЖДА и ФДЖ. На микроскопической фотографии (см. рис. 5) представлена картина периферической крови больного РПК с АС, которую видит врач-морфолог под микроскопом в результате специальной окраски препарата крови. Это неполноценные эритроциты маленького размера, с гипохромией и пойкилоцитозом. Иными словами, уже на этом этапе врач-морфолог может порекомендовать врачу-онкологу назначение более детальных анализов крови, в частности исследование параметров феррокинетики и фетального HGB, сбор тщательного анамнеза пациента. Поскольку такая же картина крови

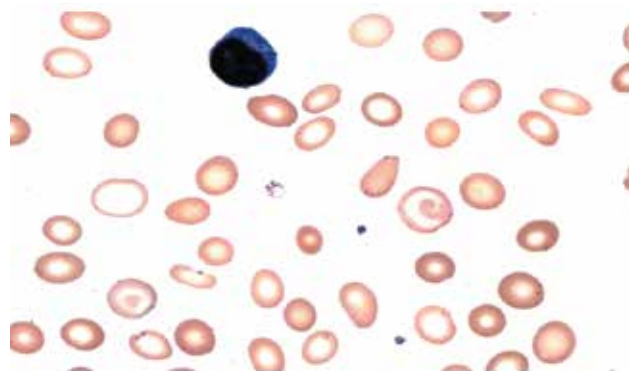


Рис. 5. Картина периферической крови под микроскопом ($\times 1000$) у больного раком прямой кишки с железодефицитной анемией (микроцитоз, гипохромия, пойкилоцитоз)

Fig. 5. Microscopic picture ($\times 1000$) of peripheral blood in a patient with rectal cancer and iron deficiency anemia (microcytosis, hypochromia, poikilocytosis)

может встречаться и при наследственной гемолитической анемии — талассемии. В нашем случае, как видно из диаграммы, наиболее низкие значения RBC, HGB, НСТ ($p < 0,001$) отмечали у больных с ФДЖ по сравнению с аналогичными показателями больных с ЖДА (см. рис. 1, 2). Значительные различия отмечены при анализе показателей ФР, ГП-25 и ИЛ-6. Концентрация этих показателей у больных с ФДЖ превышала соответствующие параметры как в группе контроля, так и у больных с ЖДА ($p < 0,001$). Отмечен интересный факт, что у пациентов с ФДЖ статистически значимо увеличено количество фрагментов RBC (разрушенных эритроцитов) не только по сравнению с контролем, больными с ЖДА, но и с группой РПК, у которых не был диагностирован АС ($p < 0,001$; см. рис. 4). Это может свидетельствовать о функциональной неполноценности RBC, снижении их резистентности, что, в свою очередь, может способствовать их разрушению, снижению срока жизни и усугублению АС у больных РПК с ФДЖ. Следует отметить, что ФДЖ встречался только у больных с IIIB, IIIC–IV стадиями заболевания, что свидетельствовало о длительном процессе формирования АС или о АХЗ. Причем нарушение метаболизма железа выявлено не только у больных с АС, но и в группе больных РПК с нормальными показателями гемограммы, что может свидетельствовать о латентном дефиците железа. Это проявлялось в снижении запаса железа (ФР) ниже пороговой величины у отдельных больных без АС. Данные литературы показали, что абсолютный дефицит железа у онкологических больных констатируется при уровне ФР < 30 нг/мл [8]. Кроме того, у значительной части больных без АС выявлена гиперпродукция ГП-25, которая не сопровождалась высокой экспрессией ИЛ-6. Это может свидетельствовать о том, что причиной значительной

концентрации ГП-25 в этом случае, кроме ИЛ-6, могут быть другие источники. В недавних исследованиях продемонстрировано, что ГП-25, пептидный гормон, вырабатываемый главным образом гепатоцитами, могут синтезировать опухолевые клетки [10, 11]. В настоящее время появился большой интерес к исследованию ГП-25 и ИЛ-6 у онкологических больных с АС, так как разрабатываются ряд агонистов и антагонистов ГП-25, некоторые из них находятся на стадии клинических исследований [9, 11, 12]. Появились моноклональные антитела против ИЛ-6 (силтуксимаб) и рецептора ИЛ-6 (тоцилизумаб) в качестве потенциальных средств иммунотерапии, в монотерапии и комбинации для лечения не только АС, но и рака [13].

У всех больных РПК с АС исследовали плазменный уровень ЭПО – гормона, который осуществляет контроль пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников эритроидного ряда. Другой важной особенностью ЭПО является свойство предотвращать апоптоз на поздних стадиях развития эритрокариоцитов путем торможения их фагоцитоза макрофагами. ЭПО вырабатывается почками в ответ на уменьшение тканевой оксигенации.

Определение концентрации ЭПО в крови применяется как дополнительный тест для установления причин анемии и ее коррекции рекомбинантными ЭПО. Запасов ЭПО в организме не обнаружено, его референсный уровень в плазме крови составляет 4,3–32,9 МЕ/мл во всех возрастных группах. Норма условная, при развитии АС продукция ЭПО повышается соответственно степени тяжести АС, т. е. имеется адекватная продукция ЭПО. Эмпирически

доказано, что чем ниже уровень HGB, тем выше плазменный уровень ЭПО. Такая ситуация может проследиваться у пациентов без онкопатологии с начальной стадией ЖДА и острой аутоиммунной гемолитической анемией. Для онкологических больных с АС характерна неадекватная продукция ЭПО [14, 15]. Как показало и наше исследование, только у отдельных больных РПК с ЖДА выявили адекватный его уровень, а у остальных больных с АС, в том числе и с ФДЖ, он оказался относительно низким (см. рис. 3).

Заключение

Таким образом, почти у 1/2 (47 %) обследованных – больных РПК – до операции выявлен АС в вариантах ЖДА и ФДЖ. Для всех вариантов были характерны микроцитоз, гипохромия эритроцитов и ретикулоцитов, что свидетельствовало о железодефицитном эритропоэзе. Однако у больных с ППВ, ППС–IV стадиями заболевания и с ФДЖ концентрация ФР, ГП-25, ИЛ-6, FRG оказалась статистически значимо выше, а уровни RBC, HGB, НСТ ниже, чем у больных с ЖДА, что указывало на длительный процесс формирования АС или АХЗ. Следует отметить, что отклонения от референсного значения уровня ГП-25 и ФР выявлены не только у больных с ФДЖ, но и у отдельных больных без гематологических признаков анемии, что не исключало латентной стадии АС. Дефицит ЭПО относительно степени тяжести АС установлен во всех вариантах. Исследование было малочисленным, что не позволяет сделать однозначный вывод о роли ГП-25 и ИЛ-6 в патогенезе варианта АС с ФДЖ у больных РПК и требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424. DOI: 10.3322/caac.21492
2. Ferlay J., Ervik M., Lam F. et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (2018). URL: <https://gco.iarc.fr/today>.
3. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shachzadova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii, 2021. 252 p. (In Russ.).
4. Natalucci V., Virgili E., Calcagnoli F. et al. Cancer related anemia: an integrated multitarget approach and lifestyle interventions. *Nutrients* 2021;13(2):482. DOI: 10.3390/nu13020482
5. Gvartzman R., Livovsky D.M., Tahover E. et al. Anemia can predict the prognosis of colorectal cancer in the pre-operative stage: a retrospective analysis. *World J Surg Onc* 2021;19(1):341. DOI: 10.1186/s12957-021-02452-7
6. Yamada T., Endo H., Hasegawa H. et al. Presurgical mild anemia is a risk factor for severe postoperative complications in rectal cancer surgery: a nationwide retrospective cohort study in Japan. *Ann Gastroenterol Surg* 2024;8(3):471–80. DOI: 10.1002/ags3.12770
7. Deng Yu., Weng M., Zhang J. Preoperative anemia and long-term survival in patients undergoing colorectal cancer surgery: a retrospective cohort study. *World J Surg Onc* 2023;21(1):122. DOI: 10.1186/s12957-023-03005-w
8. Aapro M., Beguin Y., Bokemeyer C. et al. Management of anemia and iron deficiency in patients with cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2018;29(Suppl. 4):iv96–110. DOI: 10.1093/annonc/mdx758

9. Nemeth E., Ganz T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. *Int J Mol Sci* 2021;22(12):6493. DOI: 10.3390/ijms22126493
10. Wang J., Liu W., Li J.C. et al. Hepcidin downregulation correlates with disease aggressiveness and immune infiltration in liver cancer. *Front Oncol* 2021;11:714756. DOI: 10.3389/fonc.2021.714756
11. Di Grazia A., Di Fusco D., Franze E. et al. Hepcidin upregulation in colorectal cancer is associated with the accumulation of regulatory macrophages and epithelial-mesenchymal transition and correlates with disease progression. *Cancers (Basel)* 2022;14(21):5294. DOI: 10.3390/cancers14215294
12. Sasu B.J., Cooke K.S., Arvedson T.L. et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* 2010;115(17):3616–24. DOI: 10.1182/blood-2009-09-245977
13. Eskandari F., Dürr M., Buddy K. et al. Clazakizumab in late antibody-mediated rejection: study protocol of a randomized controlled pilot trial. *Trials* 2019;20(1):37. DOI: 10.1186/s13063-018-3158-6
14. Bohlius J., Bohlke K., Castelli R. et al. Management of cancer-associated anemia with erythropoiesis-stimulating agents: ASCO/ASH clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2019;37(15):1336–51. DOI: 10.1200/JCO.18.02142
15. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Климанов И.А. Эндогенный эритропоэтин в периферической крови у больных колоректальным раком с анемическим синдромом. *Клиническая лабораторная диагностика* 2024;69(3):148–52. DOI: 10.51620/0869-2084-2024-69-3-148-152
- Blindar' V.N., Zubrixina G.N., Klimanov I.A. Endogenous erythropoietin in peripheral blood in patients with colorectal cancer with anemic syndrome. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2024;69(3):148–52. (In Russ.). DOI: 10.51620/0869-2084-2024-69-3-148-152

Вклад авторов

В.Н. Блиндарь: разработка дизайна исследования, анализ публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

И.А. Климанов: критический пересмотр статьи с внесением ценного интеллектуального содержания.

Author's contributions

V.N. Blindar: development of research design, analysis of publications on the topic of the article, writing the text of the article;

I.A. Klimanov: critical revision of the article with the introduction of valuable intellectual content.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.Н. Блиндарь / V.N. Blindar: <https://orcid.org/0000-0002-4630-4988>

И.А. Климанов / I.A. Klimanov: <https://orcid.org/0000-0001-8593-1098>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», выписка из протокола №3 от 27.03.2025.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study was approved by the Ethics Committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, extract from Protocol No. 3 dated 27.03.2025.

Статья поступила: 07.04.2025. Принята к публикации: 18.08.2025. Опубликовано онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 07.04.2025. Accepted for publication: 18.08.2025. Published online: 25.09.2025.

Прогностическое значение экспрессии маркеров Е-кадгерина и TWIST в первичных опухолевых блоках пациентов с меланомой кожи ранних стадий и распространенным раком прямой кишки: влияние на прогноз заболевания и эффективность проводимого лечения

Е.А. Пасечникова^{1,2}, А.Ю. Георгиева², В.Н. Бодня^{1,3}, Д.В. Кадомцев², В.А. Порханов^{1,3},
А.А. Вережкин¹, С.Д. Максименко²

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 350063 Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4;

²ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» Минздрава Краснодарского края; Россия, 350040 Краснодар, ул. Димитрова, 146;

³ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского» Минздрава Краснодарского края; Россия, 350086 Краснодар, ул. 1 Мая, 167

Контакты: Елизавета Александровна Пасечникова pasechnikovali@rambler.ru

Цель исследования — оценить прогностическую значимость экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода TWIST и Е-кадгерина в первичных опухолях у пациентов с меланомой кожи ранних стадий и распространенным раком прямой кишки, выявить связь экспрессии с клинико-морфологическими характеристиками опухоли, риском прогрессирования и ответом на проводимое лечение.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ данных 2 когорт пациентов. Первая когорта включала 101 пациента с меланомой кожи с распространенностью первичной опухоли pT1a–1b. Вторая когорта — 75 пациентов с распространенным раком прямой кишки (T3–4N0–2M0), получивших неoadъювантную химиолучевую терапию. Во всех случаях проводили иммуногистохимическую оценку экспрессии TWIST и Е-кадгерина в первичных опухолях. Анализировали связь с прогрессированием заболевания, эффектом терапии и морфологическими характеристиками.

Результаты. У пациентов с меланомой кожи снижение экспрессии Е-кадгерина (<80 %) и повышение TWIST (>20 %) ассоциировалось с риском прогрессирования заболевания в течение 5 лет ($p < 0,01$). При раке прямой кишки аналогичные профили экспрессии коррелировали с худшим эффектом от химиолучевой терапии (tumor regression grading: 3–4), низким уровнем патоморфоза, а также со снижением общей и безрецидивной выживаемости ($p < 0,05$). TWIST и Е-кадгерин демонстрируют независимую прогностическую значимость при обоих типах опухолей.

Заключение. Изменение экспрессии маркеров TWIST и Е-кадгерина в первичных опухолях отражает активацию эпителиально-мезенхимального перехода, ассоциированного с агрессивным клиническим течением, сниженной чувствительностью к терапии и повышенным риском прогрессирования. Эти маркеры могут быть использованы для уточнения стратификации риска и индивидуализации лечебной тактики.

Ключевые слова: меланома кожи, рак прямой кишки, эпителиально-мезенхимальный переход, TWIST, Е-кадгерин

Для цитирования: Пасечникова Е.А., Георгиева А.Ю., Бодня В.Н. и др. Прогностическое значение экспрессии маркеров Е-кадгерина и TWIST в первичных опухолевых блоках пациентов с меланомой кожи ранних стадий и распространенным раком прямой кишки: влияние на прогноз заболевания и эффективность проводимого лечения. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):70–82.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-70-82>

Prognostic significance of TWIST and E-cadherin expression in primary tumor blocks of patients with early-stage melanoma and locally advanced rectal cancer: impact on disease outcome and therapy effectiveness

Elizaveta A. Pasechnikova^{1,2}, Anastasiia Yu. Georgieva², Vadim N. Bodnya^{1,3}, Dmitry V. Kadomtsev², Vladimir A. Porkhanov^{1,3}, Alexandr A. Verevkin¹, Sofia D. Maksimenko²

¹Kuban State Medical University, Ministry of Health of Russia; 4 Mitrofana Sedina St., Krasnodar 350063, Russia;

²Clinical Oncology Dispensary № 1, Ministry of Health of the Krasnodar Krai; 146 Dimitrova St., Krasnodar 350040, Russia;

³Research Institute – Ochapovsky Regional Hospital № 1, Ministry of Health of the Krasnodar Krai; 167 1 Maya St., Krasnodar 350086, Russia

Contacts: Elizaveta Aleksandrovna Pasechnikova pasechnikovali@rambler.ru

Aim. To assess the prognostic value of TWIST and E-cadherin expression in primary tumor samples of patients with early-stage cutaneous melanoma and locally advanced rectal cancer. To determine their association with clinicopathological features, risk of progression, and treatment response.

Materials and methods. A retrospective analysis of two patient cohorts was performed. The first cohort included 101 patients with pT1a–1b cutaneous melanoma. The second cohort comprised 75 patients with locally advanced rectal cancer (T2–4N0–2M0) who underwent neoadjuvant chemoradiotherapy. In all cases, immunohistochemical assessment of TWIST and E-cadherin expression in primary tumors was carried out. Associations with disease progression, treatment effectiveness, and histopathological features were analyzed.

Results. In melanoma patients, reduced E-cadherin expression (<80 %) and elevated TWIST expression (>20 %) were significantly associated with 5-year disease progression ($p < 0.01$). In rectal cancer patients, similar expression profiles correlated with poor response to chemoradiotherapy (tumor regression grading: 3–4), low tumor regression grade, and reduced overall and disease-free survival ($p < 0.05$). TWIST and E-cadherin demonstrated independent prognostic significance in both cancer types.

Conclusion. Altered TWIST and E-cadherin expression in primary tumors reflects epithelial – mesenchymal transition activation, associated with aggressive clinical behavior, therapy resistance, and higher risk of disease progression. These markers may be used to refine risk stratification and guide treatment personalization.

Keywords: cutaneous melanoma, rectal cancer, epithelial-mesenchymal transition, TWIST, E-cadherin

For citation: Pasechnikova E.A., Georgieva A.Yu., Bodnya V.N. et al. Prognostic significance of TWIST and E-cadherin expression in primary tumor blocks of patients with early-stage melanoma and locally advanced rectal cancer: impact on disease outcome and therapy effectiveness. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2025;24(3):70–82. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-70-82>

Введение

Молекулярное прогрессирование злокачественных опухолей — меланомы кожи и колоректального рака — включает комплекс взаимосвязанных процессов, среди которых ключевую роль играют эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и ремоделирование опухолевого микроокружения (ОМ). Следует подчеркнуть, что классическое определение ЭМП как утраты эпителиальных признаков и приобретения мезенхимального фенотипа применимо преимущественно к опухолям эпителиального происхождения, в частности к раку прямой кишки (РПК). В отношении меланомы как опухоли нейроэктодермального происхождения корректнее говорить об ЭМП-подобной трансформации — совокупности изменений, морфологически и функционально сходных с ЭМП (например, об утрате экспрессии Е-кадгерина, повышении инвазивности, лекарственной устойчивости), но происходящих вне контекста эпителиальной дифференцировки. Таким образом, в на-

стоящем исследовании процессы клеточной дедифференцировки в обеих опухолях рассматриваются в рамках общей концепции опухолевой пластичности и перехода к более агрессивному фенотипу [1–3].

Показано, что ЭМП представляет собой феномен потери опухолевыми клетками эпителиальных признаков (полярности, адгезии, низкой миграции) и приобретения мезенхимальных свойств (подвижности, инвазивности, лекарственной устойчивости) [4, 5]. ЭМП — комплексное явление, отражающее опухолевую пластичность и дедифференцировку и типичное не только для эпителиальных опухолей, но и для опухолей неэпителиального происхождения, в частности меланомы [6]. ОМ играет критическую роль в формировании агрессивного фенотипа злокачественных клеток, модулируя процессы инвазии, устойчивости к терапии и уклонения от иммунного надзора. Элементы ОМ, включая рак-ассоциированные фибробласты, лимфоидные и миелоидные клетки, а также такие факторы, как трансформирующий

фактор роста β (transforming growth factor β , TGF- β) и гипоксия, инициируют активацию ЭМП-программ и поддерживают пластичность опухолевых клеток. В зависимости от гистогенеза опухоли и ее локализации микросреда приобретает специфические черты, определяя направление дедифференцировки [7].

При меланоме, характеризующейся высокой иммунной пластичностью и гетерогенностью, ОМ формирует иммунорезистентный фенотип с преобладанием Т-клеточной дисфункции и гипоксических зон [3, 8]. В отличие от нее при РПК преобладает радиорезистентный и иммуносупрессивный профиль с выраженной активацией ассоциированных с опухолью фибробластов (cancer-associated fibroblasts, CAF) и TGF- β -сигнального пути [9].

Именно синергия ЭМП и ОМ – 2 фундаментальных компонентов фенотипической пластичности – определяет ключевые механизмы прогрессии и терапевтической неудачи [10, 11]. При этом транскрипционные регуляторы TWIST и молекулы клеточной адгезии, такие как Е-кадгерин, являются как маркерами, так и активными участниками этих процессов.

Транскрипционный фактор TWIST индуцирует ЭМП и формирование раковых стволовых клеток, репрессирует Е-кадгерин и активирует инвазию, терапевтическую устойчивость, а также ремоделирование ОМ [1, 12]. Е-кадгерин, напротив, обеспечивает межклеточную адгезию, а его утрата сопровождается переходом к более злокачественным фенотипам [13, 14].

Несмотря на значительное количество научных публикаций, сравнительная оценка TWIST и Е-кадгерина в первичных опухолях с различным гистогенезом остается редкой. Особую ценность представляет изучение этих маркеров именно в первичной опухоли как в исходной точке каскада прогрессии [15].

Цель настоящего исследования – оценить прогностическую значимость экспрессии маркеров ЭМП TWIST и Е-кадгерина в первичных опухолях у пациентов с меланомой кожи ранних стадий и распространенным РПК, выявить связь экспрессии с клинико-морфологическими характеристиками опухоли, риском прогрессирования и ответом на проводимое лечение.

Материалы и методы

Клинические и гистопатологические параметры включенных в исследование пациентов представлены в табл. 1. Анализу подверглись 2 независимые когорты: 101 пациент с меланомой кожи ранних стадий (с распространенностью первичной опухоли до 1 мм по Бреслоу включительно, с изъязвлением либо без такового) и 75 пациентов с местно-распространенным колоректальным раком (II–III стадии, Т3–4 и/или

N⁺ по классификации TNM (tumor, nodus, metastasis), получивших неoadъювантную химиолучевую терапию.

Таблица 1. Клинические характеристики включенных пациентов
Table 1. Clinical characteristics of included patients

Параметр Parameter	Меланома кожи (n = 101) Cutaneous melanoma (n = 101)	Рак прямой кишки (n = 75) Rectal cancer (n = 75)
Средний возраст, лет Average age, years	54,3 ± 12,6	61,7 ± 10,4
Женщины/мужчины, абс. Women/men, abs.	58/43	31/44
Распространенность первичной опухоли (Т) абс.: Primary tumor prevalence (T) abs.:	T1a: 47; T1b: 54	TII: 19; TIII: 56
Медиана наблюдения, мес Median follow-up, month	60	30
Высокая экспрессия TWIST, абс. (%) High expression of TWIST, abs. (%)	29 (28,7)	33 (44)
Низкая экспрессия Е-кадгерина, абс. (%) Low expression of E-cadherin, abs. (%)	36 (35,6)	29 (38,7)

По каждой группе пациентов проанализированы клиничко-эпидемиологические характеристики (возрастно-половая структура), морфологические и молекулярные признаки опухоли (стадия, уровень инвазии, степень дифференцировки, наличие язвенного компонента, митотический индекс и др.), а также особенности проводимого лечения. Для когорты пациентов с РПК дополнительно учитывали данные об ответе на неoadъювантную терапию, определяемом по системе TRG (tumor regression grade).

В табл. 1 отражены частота и распределение ключевых клиничко-патологических характеристик в зависимости от уровня экспрессии TWIST и Е-кадгерина. Статистическую обработку категориальных признаков осуществляли с использованием критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера в зависимости от условий применимости. Порог значимости был установлен на уровне $p < 0,05$.

Когорта 1. Меланома кожи ранних стадий

В исследование включен 101 пациент с первичной меланомой кожи, распространенностью первичной

опухоли pT1a–1b, наблюдавшийся и лечившийся в Клинический онкологический диспансер № 1 (Краснодар) в период с 2013 по 2020 г. Критерием включения служило наличие архивных гистологических блоков первичной опухоли с достаточным объемом материала для иммуногистохимического анализа. Средний возраст пациентов составил $58,6 \pm 9,7$ года, соотношение мужчин и женщин — 1:1.

Всем пациентам проводили гистологическую верификацию диагноза и оценку клинико-морфологических параметров: глубину инвазии по Бреслоу и Кларку, наличие изъязвления, митотическую активность. Прогрессирование заболевания оценивали в течение 5 лет наблюдения, включая как местные рецидивы, так и регионарные/отдаленные метастазы.

Парафиновые блоки подвергали стандартной гистологической обработке: фиксации в 10 % нейтральном формалине, проводке, заливке в парафин, нарезке срезов толщиной 4 мкм. Иммуногистохимическое окрашивание проводили на автоматическом стейнере Thermo Scientific Ultra (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием следующих антител:

- Е-кадгерина Rabbit Polyclonal (Quartett, Германия) 1:50, буфер ER2;
- TWIST Rabbit Polyclonal (Cell Marque, США) 1:150, буфер ER2.

Система визуализации — UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, Inc., США). Оценка проводили 2 независимых морфолога (слепой анализ) в 3 полях зрения при увеличении 200, 300 и 400 с учетом процента позитивных опухолевых клеток. В каждой пробе оценивали 200–300 клеток.

Пороговые значения экспрессии определены с использованием ROC-анализа:

- Е-кадгерин: низкая экспрессия — $<80\%$, высокая — $\geq 80\%$;
- TWIST: высокая экспрессия — $>20\%$, низкая — $\leq 20\%$.

Когорта 2. Распространенный рак прямой кишки

В исследование вошли 75 пациентов с диагнозом аденокарциномы прямой кишки стадии cT2–T4N0–2M0, получивших неoadъювантную химиолучевую терапию с последующим хирургическим лечением в отделении радиотерапии НИИ — ККБ № 1 им. проф. С.В. Очаповского (Краснодар) в 2020–2023 гг.

Химиолучевую терапию проводили по стандартной схеме: суммарная очаговая доза составляла 44–50 Гр, фракционирование — 2 Гр 5 раз в неделю, на фоне перорального приема капецитабина в дозе 825 мг/м² дважды в сутки. Интервал между завершением терапии и операцией составлял в среднем 6–8 нед. Все пациенты были прооперированы в объеме тотальной

мезоректальной эксцизии, что позволило получить радикальные морфологические препараты.

Иммуногистохимическое исследование выполняли на диагностических биоптатах опухоли до начала лечения. Препараты фиксировали в 10 % нейтральном формалине, заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм. Окрашивание проводили на автоматическом стейнере Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems Inc., США) с применением:

- Е-кадгерина Rabbit Polyclonal (Quartett, Германия) 1:50, буфер ER2;
- TWIST Rabbit Polyclonal (Cell Marque, США) 1:150, буфер ER2.

Оценку окрашивания проводили 2 морфолога слепым методом. TWIST учитывали как ядерную экспрессию, Е-кадгерин — как мембранную. В каждом случае анализировали не менее 3 полей зрения при увеличении 200, 300 и 400 с подсчетом не менее 200 опухолевых клеток.

Шкала оценки экспрессии:

- TWIST: высокая экспрессия — $\leq 20\%$ опухолевых ядер, слабая/отсутствующая — $\leq 20\%$;
- Е-кадгерин: сохраненная экспрессия — $\geq 80\%$ опухолевых клеток с четким мембранным окрашиванием, сниженная — $<80\%$.

Эффективность неoadъювантной терапии оценивали по степени лечебного патоморфоза в резецированном материале по классификации Dworak (TRG) [18].

Пациенты были сгруппированы по уровню эффекта:

- группа с выраженным ответом: TRG 0–1 ($n = 32$);
- группа с невыраженным ответом: TRG 2–4 ($n = 43$).

Ассоциации между экспрессией маркеров и TRG оценивали с помощью χ^2 -критерия, а также однофакторного и многофакторного логистического анализа. Дополнительно проводили расчет безрецидивной выживаемости и общей выживаемости методом Каплана–Майера с последующим *log-rank*-тестом. Для оценки статистических различий использовали χ^2 -критерий Пирсона, односторонний анализ ROC-кривых с расчетом AUC (area under curve), логистическую регрессию. Уровень статистической значимости — $p < 0,05$. Все расчеты проводили в среде SPSS Statistics v.26.0 (IBM, США) и GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, LLC, США). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Для обеих когорт — меланомы кожи и РПК — построены отдельные ROC-кривые, представленные на рис. 1. Это позволило визуализировать различия и подтвердить применимость одного порогового значения маркеров (TWIST $>20\%$, Е-кадгерин $<80\%$) для стратификации риска: TWIST: AUC = 0,748

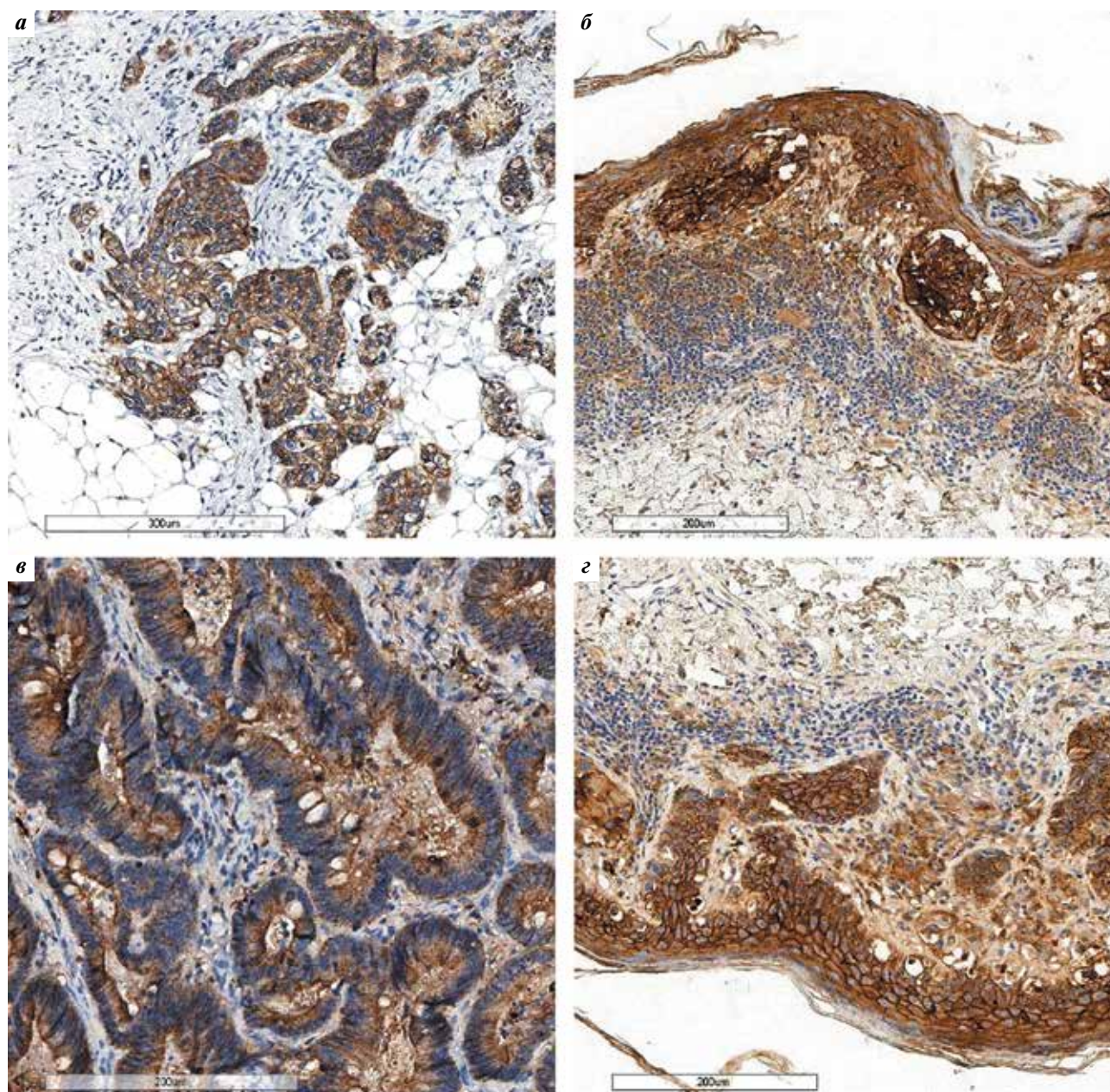


Рис. 1. Уровень экспрессии TWIST: а — высокий — в аденокарциноме прямой кишки, $\times 300$; б — высокий — в меланоме с изъязвлением, $\times 200$; в — низкий — в аденокарциноме прямой кишки, $\times 200$; г — низкий — в меланоме без изъязвления, $\times 200$. Окраска гематоксилином + иммуногистохимическое окрашивание TWIST

Fig. 1. TWIST expression: а — high — in rectal adenocarcinoma, $\times 300$; б — high — in ulcerated melanoma, $\times 200$; в — low — in rectal adenocarcinoma, $\times 200$; г — low — in non-ulcerated melanoma, $\times 200$. Hematoxylin and immunohistochemical staining for TWIST

(95 % доверительный интервал (ДИ) 0,64–0,86),
Е-кадгерин: AUC = 0,771 (95 % ДИ 0,66–0,87).

Иммуногистохимические характеристики экспрессии маркеров

Иммуногистохимическое окрашивание TWIST демонстрировало преимущественно ядерную локализацию сигнала в опухолевых клетках, с вариательной интенсивностью (см. рис. 1).

Экспрессия Е-кадгерина была мембранной, четкой у пациентов с благоприятным клиническим течением, с равномерным окрашиванием по периферии опухолевых клеток. При снижении экспрессии наблюдали участки с фрагментарным или полным отсутствием мембранного окрашивания, в отдельных случаях — с цитоплазматической переориентацией сигнала (рис. 2), что коррелировало с признаками дедифференцировки и худшим прогнозом.

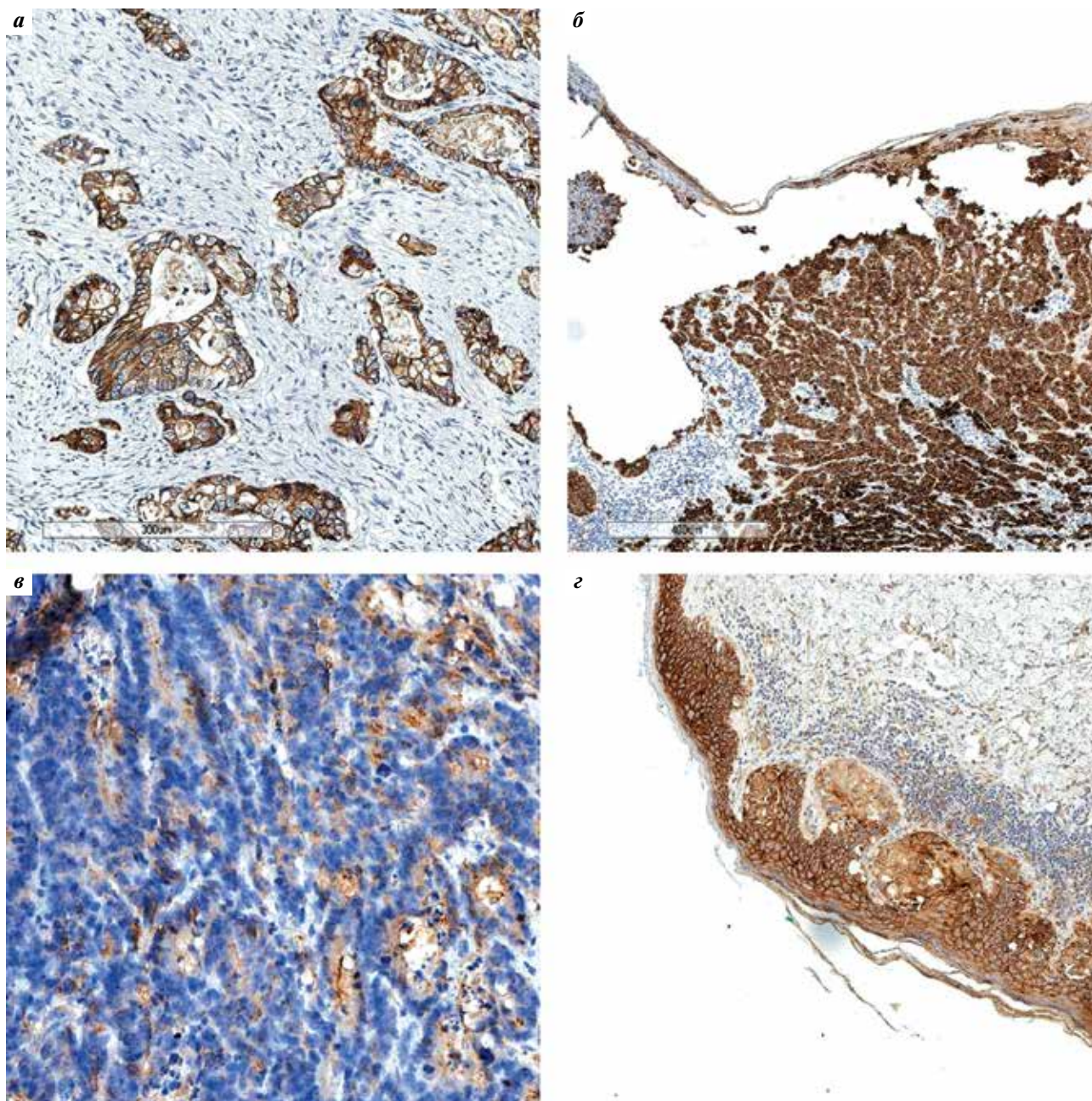


Рис. 2. Уровень экспрессии *E*-кадгерина: а – высокий – в аденокарциноме прямой кишки, $\times 300$; б – высокий – в меланоме с изъязвлением, $\times 400$; в – низкий – в аденокарциноме прямой кишки, $\times 200$; г – низкий – в меланоме без изъязвления, $\times 300$. Окраска гематоксилином + иммуногистохимическое окрашивание *E*-кадгерином

Fig. 2. *E*-cadherin expression: а – high – in rectal adenocarcinoma, $\times 300$; б – high – in ulcerated melanoma, $\times 400$; в – low – in rectal adenocarcinoma, $\times 200$; г – low – in non-ulcerated melanoma, $\times 300$. Hematoxylin and immunohistochemical staining for *E*-cadherin

Полученные паттерны экспрессии визуально подтверждают количественные различия между группами и соответствуют ожидаемым фенотипическим признакам активации ЭМП или ЭМП-подобной программы в зависимости от нозологической формы.

В логистической регрессии (модель с поправкой на пол, возраст, уровень Бреслоу) оба маркера сохра-

няли независимую ассоциацию с прогрессированием (TWIST: отношение шансов 3,91; $p = 0,004$; *E*-кадгерин: отношение шансов 0,26; $p = 0,001$).

Для каждой опухоли построены индивидуальные кривые с расчетом показателя AUC, чувствительности и специфичности. Совмещенное отображение позволяет визуально сравнить дискриминационные характеристики маркеров в разных опухолях (рис. 3).

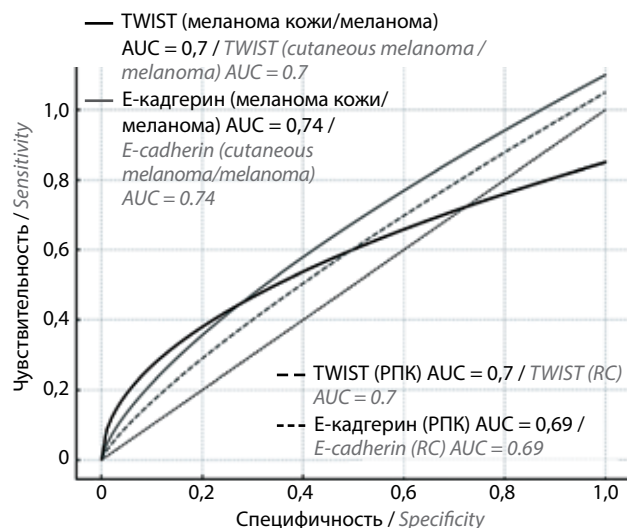


Рис. 3. Кривые receiver operating characteristic для оценки прогностической значимости TWIST и E-кадгерина в 2 когортах: меланома кожи и рак прямой кишки (РПК). AUC — площадь под кривой. Маркеры демонстрируют удовлетворительную дискриминационную способность в обеих когортных группах

Fig. 3. Receiver operating characteristic curves for assessing the prognostic value of TWIST and E-cadherin in two patient cohorts: cutaneous melanoma and rectal cancer (RC). AUC — area under the curve. The markers demonstrate satisfactory discrimination ability in both cohort groups

Когорта 1. Меланома кожи

Из 101 включенного пациента с меланомой кожи ранних стадий у 21 (20,8 %) зафиксировано прогрессирование заболевания в течение 5-летнего периода наблюдения: у 5 пациентов развился регионарный рецидив, у 16 — отдаленные метастазы. Медиана времени до прогрессирования составила 18,4 мес.

Низкую экспрессию E-кадгерина (<80 %), которая была статистически значимо ассоциирована с прогрессированием заболевания ($\chi^2 = 12,04$; $p = 0,0005$), наблюдали у 36 (35,6 %) пациентов. Положительная прогностическая ценность сохраненной экспрессии составила 87,5 %.

Высокая ядерная экспрессия TWIST (>20 %) выявлена у 29 пациентов (28,7 %) и также коррелировала с увеличением риска рецидива или метастазирования ($\chi^2 = 9,31$; $p = 0,0023$). У пациентов с высоким уровнем TWIST медиана времени до прогрессирования составила 13,6 мес, в то время как при низком уровне маркера — более 60 мес ($p < 0,001$). Для оценки прогностической значимости маркеров TWIST и E-кадгерина в отношении риска прогрессирования проведен ROC-анализ (рис. 4).

Оба маркера показали удовлетворительную дискриминационную способность:

- TWIST: AUC = 0,748 (95 % ДИ 0,64–0,86; $p < 0,001$), оптимальный порог — 20 % экспрессирующих клеток (чувствительность — 72 %, специфичность — 69 %);

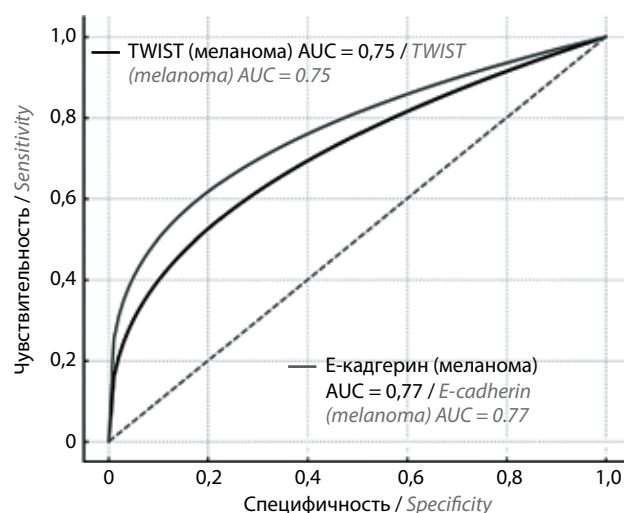


Рис. 4. Кривые receiver operating characteristic для оценки прогностической значимости экспрессии TWIST и E-кадгерина у пациентов с меланомой кожи ранней стадии. AUC — площадь под кривой

Fig. 4. Receiver operating characteristic curves for TWIST and E-cadherin in patients with early-stage cutaneous melanoma. AUC — area under the curve

- E-кадгерин: AUC = 0,771 (95 % ДИ 0,66–0,87; $p < 0,001$), порог <80 % позитивных клеток (чувствительность — 78 %, специфичность — 70 %) [13, 17].

Совместный профиль TWIST↑/E-кадгерин↓ увеличивал AUC до 0,802, что подтверждает комплементарность маркеров [25].

Для оценки влияния экспрессии данных маркеров на прогрессирование у пациентов с меланомой кожи ранних стадий показаны площади под кривыми (AUC) для TWIST (0,748; 95 % ДИ 0,64–0,86) и E-кадгерина (0,771; 95 % ДИ 0,66–0,87). Маркеры продемонстрировали удовлетворительную дискриминационную способность в прогнозировании 5-летнего риска прогрессирования заболевания. Кроме того, экспрессия TWIST и снижение E-кадгерина коррелировали с более низкой безрецидивной выживаемостью:

- TWIST высокий: безрецидивная выживаемость — 41,2 %;
- TWIST низкий: безрецидивная выживаемость — 78,6 % ($\log\text{-rank } p = 0,002$);
- E-кадгерин <80 %: безрецидивная выживаемость — 45,3 % vs 82,4 % при ≥ 80 % ($p = 0,0013$).

Когорта 2. Рак прямой кишки

Среди 75 пациентов с местно-распространенным РПК, получивших неoadъювантную химиолучевую терапию, у 32 (42,7 %) был достигнут выраженный лечебный эффект (TRG 0–1), у 43 (57,3 %) — умеренный или слабый ответ (TRG 2–4).

Высокая экспрессия TWIST выявлена у 33 (44 %) пациентов, сниженная экспрессия E-кадгерина —

у 29 (38,7 %). Оба маркера статистически значимо ассоциировались с недостаточным эффектом терапии:

- TWIST: TRG 2–4 у 28 из 33 пациентов с высокой экспрессией ($\chi^2 = 10,91$; $p = 0,001$);
- Е-кадгерин: TRG 2–4 у 25 из 29 пациентов с пониженной экспрессией ($\chi^2 = 7,45$; $p = 0,006$). ROC-анализ показал, что маркеры TWIST и Е-кадгерин также позволяют стратифицировать пациентов по вероятности слабого ответа на химиолучевую терапию (TRG 2–4): TWIST: AUC = 0,762 (95 % ДИ 0,67–0,85), порог >20 % ядерной экспрессии: чувствительность – 74 %, специфичность – 66 % [15, 23]; Е-кадгерин: AUC = 0,735 (95 % ДИ 0,62–0,84), порог <80 %: чувствительность – 70 %, специфичность – 68 % [25].

При комбинированной модели TWIST↑/Е-кадгерин↓ AUC увеличивался до 0,804, что делает ее наиболее надежным прогностическим индикатором [11, 20].

Для наглядной демонстрации прогностической значимости экспрессии TWIST и Е-кадгерина у пациентов с местно-распространенным РПК показаны AUC для TWIST (0,762; 95 % ДИ 0,67–0,85) и Е-кадгерина (0,735; 95 % ДИ 0,62–0,84) при прогнозировании недостаточного ответа на неoadъювантную химиолучевую терапию (TRG 2–4) (рис. 5).

Комбинированный профиль (TWIST↑/Е-кадгерин↓) повышал прогностическую точность до AUC = 0,804. В многофакторной модели риска прогрессирования оба маркера сохраняли независимую прогностическую значимость:

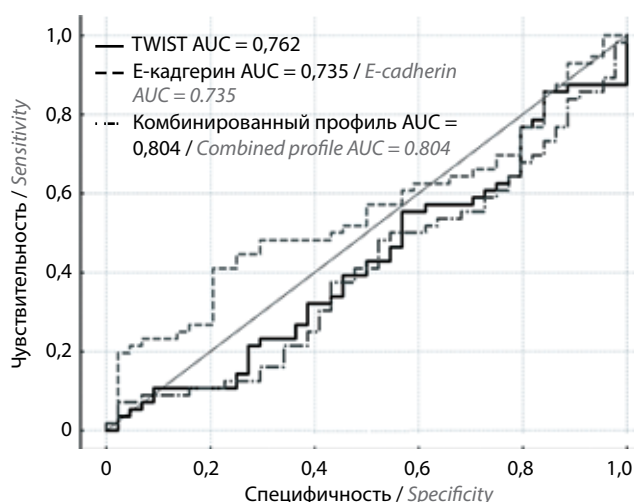


Рис. 5. Кривые receiver operating characteristic для оценки прогностической значимости экспрессии TWIST и Е-кадгерина у пациентов с местно-распространенным раком прямой кишки. AUC – площадь под кривой

Fig. 5. Receiver operating characteristic curves for TWIST and E-cadherin expression in patients with locally advanced rectal cancer. AUC – area under the curve

- TWIST: hazard ratio = 2,87 (95 % ДИ 1,41–5,79; $p = 0,003$);
- Е-кадгерин: hazard ratio = 0,39 (95 % ДИ 0,20–0,76; $p = 0,006$).

ROC-анализ позволил количественно оценить прогностическую точность каждого из маркеров. Кривые отражают соотношение чувствительности и специфичности при различных пороговых значениях экспрессии, а площадь под кривой служит интегральным показателем качества прогноза. Для обоих маркеров значения AUC >0,7 в обеих когортах подтверждают их надежную дискриминационную способность. Совместная модель, объединяющая TWIST и Е-кадгерин, демонстрирует улучшение прогностических характеристик, что подчеркивает комплементарную роль этих маркеров в механизмах опухолевой дедифференцировки.

Обсуждение

Полученные результаты подтверждают высокую прогностическую значимость маркеров TWIST и Е-кадгерина при меланоме кожи и местно-распространенном РПК. При этом необходимо учитывать принципиальные различия в гистогенезе этих опухолей: если для колоректального рака активация ЭМП соответствует классической модели потери эпителиального фенотипа, то в случае меланомы мы имеем дело с ЭМП-подобными процессами, отражающими переход нейроэктодермальных клеток к инвазивному терапевтически устойчивому состоянию. Это методологическое ограничение требует осторожного использования термина «эпителиально-мезенхимальный переход» в контексте меланомы и оправдывает применение обобщающего понятия «фенотипическая пластичность опухолевых клеток» [16, 17].

Патофизиологически ЭМП представляет собой не бинарный процесс, а континуум состояний клеточной пластичности, при котором клетки переходят от эпителиального фенотипа к промежуточным и мезенхимальным программам. Он сопровождается утратой межклеточной адгезии, ремоделированием цитоскелета и экспрессией транскрипционных факторов, таких как TWIST, Snail, ZEB1 [18]. Эти изменения позволяют клеткам не только инвазировать и метастазировать, но и избегать апоптоза, снижать иммунгенность и приобретать устойчивость к действию противоопухолевых агентов [2, 7, 14].

В контексте устойчивости к лечению важнейшую роль играют так называемые раковые стволовые клетки – субпопуляции опухолевых клеток, обладающие свойствами самообновления и фенотипической пластичности. ЭМП активно вовлечен в их индукцию и поддержание, особенно в гипоксическом и иммуносупрессивном ОМ [5, 13, 15]. Именно эта

популяция, как показывают современные исследования, является основным источником рецидивов и метастазов после лечения.

TWIST — один из центральных медиаторов ЭМП, активно участвует в формировании агрессивного клинического фенотипа. В меланоме его активация связана с инвазией, уклонением от иммунного надзора и резистентностью к ингибиторам контрольных точек [19, 20]. При РПК TWIST способствует радиорезистентности, снижению эффективности апоптоза и формированию остаточных опухолевых клеток после химиолучевого воздействия [21].

Полученные результаты подтверждают высокую прогностическую значимость TWIST и Е-кадгерина в разных нозологических группах. Выбор именно этих маркеров обусловлен их двойной ролью — как ключевых медиаторов фенотипической пластичности, так и индикаторов агрессивного течения. В отличие от других транскрипционных факторов ЭМП (например, Snail, ZEB1) и мезенхимальных белков (виментин, N-кадгерин), TWIST занимает центральное положение в регуляции клеточной дедифференцировки, индуцируя инвазию, стволовость и ремоделирование микроокружения. Е-кадгерин, напротив, служит маркером эпителиального фенотипа, а его утрата прямо отражает запуск переходных программ.

Хотя множество исследований изучает экспрессию TWIST и Е-кадгерина при меланоме [22, 23] и колоректальном раке [24, 25] по отдельности, сравнительная оценка этих маркеров в первичных опухолях с разным гистогенезом (нейроэктодермальным и эпителиальным) встречается крайне редко. В большинстве работ фокус сделан либо на оценке экспрессии данных маркеров в метастазах, либо на смешанных панелях с большим количеством дополнительных маркеров. Настоящее исследование впервые сопоставляет TWIST-/Е-кадгерин-профиль именно в первичных опухолях, что важно с точки зрения стратификации риска уже на раннем этапе заболевания.

Полученные результаты следует интерпретировать с учетом роли ОМ как ключевого модулятора экспрессии TWIST и Е-кадгерина. В случае меланомы активное взаимодействие с иммунной системой, высокая инфильтрация опухоли Т-клетками и выраженная экспрессия PD-L1 формируют условия, при которых TWIST может способствовать иммунному уклонению, индуцируя Treg-поляризацию и подавляя МНС I-экспрессию. Это объясняет наблюдаемую ассоциацию TWIST с прогрессированием заболевания даже на ранних стадиях. Потеря Е-кадгерина в этой среде дополнительно нарушает тканевую организацию, облегчая диссеминацию [16, 18].

При РПК, напротив, ОМ характеризуется преобладанием фиброзных компонентов, активацией CAF и гипоксией, индуцирующей экспрессию TWIST

через TGF- β -сигналинг. Такая среда способствует радиорезистентности и снижению эффективности химиолучевой терапии. Одновременная потеря Е-кадгерина в этом контексте усиливает нарушения межклеточной адгезии, облегчая выживание опухолевых клеток после облучения. Следовательно, комбинация TWIST $\uparrow$ /Е-кадгерин $\downarrow$ может быть не только маркером пластичности, но и отражением неблагоприятной микроэкологической адаптации опухоли [5, 19].

Особый интерес представляет оценка именно первичной опухоли как «точки входа» в каскад прогрессии. В отличие от метастазов, где формируются вторичные адаптивные сигнатуры, первичная опухоль наиболее точно отражает исходную опухолевую пластичность и взаимодействие с ОМ, влияющее на чувствительность к терапии. Сравнение TWIST/Е-кадгерина в 2 таких разных биологических контекстах — не просто подтверждение их прогностической значимости, но и попытка выделить универсальные элементы дедифференцировки, релевантные для клинической стратификации [2, 17].

Е-кадгерин, напротив, играет роль «сдерживающего» фактора, обеспечивая межклеточные контакты и ингибируя β -катенин-зависимую транскрипцию. Его потеря — как вследствие эпигенетических изменений, так и транскрипционной репрессии — сопровождает большинство случаев активации ЭМП и напрямую ассоциирована с ухудшением прогноза [10, 18, 25].

Совместная экспрессия TWIST $\uparrow$ /Е-кадгерин $\downarrow$, выявленная у значительной части пациентов в обеих группах, демонстрирует наибольшую прогностическую значимость. Такой молекулярный профиль отражает активацию полной ЭМП-программы и может служить критерием стратификации риска прогрессии и нечувствительности к лечению [26].

Полученные результаты позволяют рассматривать TWIST и Е-кадгерин как потенциальные молекулярные индикаторы агрессивности опухоли и устойчивости к терапии. Однако, несмотря на выраженную ассоциацию с неблагоприятными клиническими исходами, говорить о прямом терапевтическом воздействии на указанные мишени пока преждевременно. Хотя в доклинических моделях показана роль TWIST в формировании терапевтической резистентности и иммунного уклонения, данные о клинической эффективности его ингибирования крайне ограничены. Аналогично восстановление экспрессии Е-кадгерина в условиях опухолевой среды остается сложной задачей. Профиль TWIST $\uparrow$ /Е-кадгерин $\downarrow$ может использоваться как критерий для прогностической стратификации и включения пациентов в группы с потенциально высоким риском прогрессии или неэффективности стандартного лечения.

Дальнейшие исследования необходимы для оценки терапевтической значимости этих маркеров и возможности их таргетной модуляции [27].

Таким образом, TWIST и Е-кадгерин — не только маркеры прогрессирования, но и потенциальные точки терапевтического воздействия, особенно в сочетании с данными молекулярного профилирования и оценки ОМ [3, 23, 26].

Полученные данные согласуются с рядом ранее опубликованных исследований. Так, продемонстрировано, что высокая экспрессия TWIST при меланоме ассоциирована с инвазивным фенотипом, потерей межклеточных контактов и снижением экспрессии Е-кадгерина [5]. В метаанализе Х. Не и соавт. показано, что утрата Е-кадгерина у пациентов с меланомой ассоциируется с худшим прогнозом, особенно на ранних стадиях [22].

Аналогичные выводы были сделаны в исследованиях Y. Liu и соавт., а также J.W. Luo и соавт., где экспрессия TWIST и Е-кадгерина в опухолях толстой и прямой кишки предсказывала ответ на химиолучевую терапию и вероятность прогрессии [9, 24]. Наши результаты подтверждают эти данные, расширяя их сравнительной оценкой в разных гистогенетических контекстах. Показано также, что TWIST и Slug обладают высокой прогностической ценностью при ректальном раке, особенно в рамках оценки чувствительности к терапии [5, 26, 28–32]. Мы наблюдали сходные значения AUC (0,762 и 0,735), что подтверждает их предиктивный потенциал в когорте РПК.

Так, ОМ представляет собой сложную систему клеточных и внеклеточных компонентов, включающую фибробласты, иммунные клетки, эндотелиальные элементы, внеклеточный матрикс, а также градиенты гипоксии, pH и метаболитов. В условиях меланомы, характеризующейся высокой мутационной нагрузкой и выраженной иммунной инфильтрацией, формируется фенотип «горячей», но функционально истощенной опухоли: ключевыми признаками являются дисфункция цитотоксических Т-клеток, экспрессия иммунных контрольных точек и накопление Treg-популяций [17, 27, 33]. TWIST в данной модели вовлечен в формирование иммунорезистентного фенотипа за счет подавления МНС I, активации PD-L1 и поляризации Treg-клеток, что способствует уклонению от иммунного надзора [16, 17]. Потеря Е-кадгерина дополнительно усиливает инвазию и нарушает тканевую архитектуру, способствуя диссеминации опухоли [4, 6, 8].

В случае колоректального рака, особенно местно-распространенных форм, ОМ характеризуется выраженной фиброзной трансформацией с активацией CAF, секрецией TGF- β , интерлейкина-6 и фактора роста эндотелия сосудов, а также сниженной инфильтрацией CD8⁺-Т-клеток [7, 23, 24, 29]. TWIST

активируется под действием TGF- β /SMAD-сигналинга и способствует радиорезистентности путем ингибирования апоптоза и повышения репаративной активности [9, 11]. Снижение экспрессии Е-кадгерина при этом ассоциировано с нарушением межклеточной адгезии и активацией β -катенинзависимой транскрипции [2, 4, 31, 32]. Таким образом, микро-среда в обеих опухолях не только поддерживает фенотипическую пластичность, но и формирует предпосылки для устойчивости к терапии, в том числе к иммунотерапии (меланомы) и химиолучевому воздействию (РПК) [14, 16, 28, 33].

Современные представления о пластичности опухолевых клеток предполагают существование не только бинарной модели ЭМП, но и гибридных фенотипов, сочетающих эпителиальные и мезенхимальные признаки [18, 19, 26]. Такие промежуточные состояния играют важную роль в инвазии, метастазировании и уклонении от терапии. Хотя TWIST и Е-кадгерин отражают ключевые аспекты этих процессов, они не охватывают все разнообразие регуляторов фенотипической пластичности. В литературе отмечена высокая значимость и других транскрипционных факторов — Snail, Slug, ZEB1, а также мезенхимальных структурных белков, таких как виментин и N-кадгерин, участие которых может варьироваться в зависимости от типа опухоли [16, 20, 21].

Кроме того, связь TWIST с популяцией опухолевых стволовых клеток в нашем исследовании остается опосредованной. Мы не проводили прямой оценки стволовых маркеров, а выводы сделаны на основе известной роли TWIST в индукции свойств самообновления и резистентности, описанных в литературе [12, 27, 32]. Эти ограничения следует учитывать при интерпретации данных.

Сочетание TWIST $\uparrow$ /Е-кадгерин $\downarrow$ может быть рассмотрено как потенциальный предиктор недостаточного ответа на терапию, что дает основание для модификации схем лечения: рассмотрения альтернативных режимов, добавления иммунотерапии или таргетных подходов, а также более жесткого наблюдения в послеоперационный период [5, 9, 15, 34].

Хотя полученные нами данные подтверждают схожую прогностическую значимость TWIST и Е-кадгерина при меланоме и колоректальном раке, это не обязательно означает тождественность лежащих в основе молекулярных механизмов. Указанные маркеры участвуют в разнообразных сигнальных путях, специфичных для каждой опухоли: например, в меланоме TWIST активируется преимущественно через сигналы гипоксии и MAPK-путь (mitogen-activated protein kinase), в то время как при РПК его экспрессия часто индуцируется TGF- β /SMAD-каскадом [10, 24, 30]. Аналогично утрата Е-кадгерина в меланоме может происходить как вследствие мутаций, так и под

действием иммуноиндуцированных механизмов, в то время как при колоректальном раке это чаще связано с эпигенетической репрессией [29].

Таким образом, несмотря на клиническую универсальность профиля TWIST↑/E-кадгерин↓ как маркера агрессивности опухоли, интерпретация этих изменений требует учета биологического контекста каждого новообразования.

Заключение

В проведенном исследовании впервые осуществлена сравнительная характеристика роли маркеров ЭМП TWIST и E-кадгерина в 2 принципиально различных злокачественных новообразованиях — меланоме кожи и РПК, отличающихся по происхождению, морфологии и клиническому течению.

Несмотря на эти различия, в обеих нозологических формах выявлена высокая прогностическая значимость нарушений экспрессии указанных маркеров.

Комбинация высокой экспрессии TWIST и сниженного уровня E-кадгерина ассоциирована:

- с повышенным риском прогрессирования при меланоме кожи ранних стадий;
- недостаточным ответом на химиолучевую терапию (TRG 2–4) при местно-распространенном РПК;
- статистически значимым снижением безрецидивной выживаемости при опухолях с разными молекулярными профилями.

TWIST и E-кадгерин могут рассматриваться как универсальные молекулярные индикаторы дедиффе-

ренцировки и агрессивности опухоли вне зависимости от ее гистогенеза. Их использование в рутинной практике может способствовать улучшению стратификации риска, индивидуализации схем лечения и, потенциально, внедрению таргетных подходов, направленных на ингибирование ЭМП и связанных с ним псевдостволовых состояний.

Таким образом, профиль TWIST↑/E-кадгерин↓ ассоциирован с худшим прогнозом и сниженной чувствительностью к терапии как при меланоме кожи, так и при местно-распространенном РПК. Эти данные подтверждают, что фенотипическая пластичность опухолевых клеток — независимо от гистогенеза — может оказывать сходное влияние на клиническое течение заболевания. Однако сходство прогностической значимости не обязательно отражает идентичность молекулярных механизмов: при меланоме ключевую роль может играть иммунорезистентность и взаимодействие с Т-клеточным звеном, тогда как при РПК — радиорезистентность и активация TGF-β-сигналинга. Тем не менее полученные результаты подчеркивают потенциал маркеров TWIST и E-кадгерина в качестве элементов стратификации риска и возможных кандидатов для последующего функционального изучения. Будущие исследования с включением более широкой панели маркеров и иммунных характеристик, а также функциональные *in vitro*-модели необходимы для оценки терапевтической релевантности этих находок и уточнения роли TWIST/E-кадгерина в формировании терапевтической устойчивости.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Чмыхало В.К. Взаимодействие каскада ядерного фактора каппа-би и генов — регуляторов эпителиально-мезенхимального перехода. Живые и биокосные системы 2021;(37). DOI: 10.18522/2308-9709-2021-37-3
Chmykhkalo V.K. Interaction of the nuclear factor kappa bi cascade and genes regulating the epithelial-mesenchymal transition. Zhivye y biokosnye sistemy = Living and Biotic Systems 2021;(37). (In Russ.). DOI: 10.18522/2308-9709-2021-37-3
2. Алексинский В.С., Басинский В.А. Анализ взаимосвязи экспрессии молекул клеточной адгезии E-кадгерина и β-катенина с морфологическими параметрами и прогнозом заболевания при меланоме кожи. Журнал Гродненского государственного медицинского университета 2016;3(55):58–61. Aleksinsky V.S., Basinsky V.A. Expression of E-cadherin and β-catenin molecules in skin melanoma: prognostic and morphological relevance. Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta = Journal of the Grodno State Medical University 2016;3(55):58–61. (In Russ.).
3. Глянько М.В., Безденежных Н.А., Кудрявец Ю.И. и др. Оценка наиболее информативных маркеров у больных колоректальным раком путем моделирования прогностической модели для определения вероятности прогрессирования заболевания. Онкологический журнал 2017;11(41):13–20. Glyanko M.V., Bezdniezhnykh N.A., Kudryavets Yu.I. et al. Assessment of the most important marker in patients with colorectal cancer through modeling forecasting models to determine the probability of disease progression. Onkologicheskij zhurnal = Oncological Journal 2017;11(41):13–20. (In Russ.).
4. Розенфельд И.И., Шестакова В.Г., Нигматуллина Л.И., Камалова Н.Е. Патолофизиологическое значение E-кадгерина в развитии злокачественных новообразований. Международный журнал медицины и психологии 2020;3(5):100–6. Rosenfeld I.I., Shestakova V.G., Nigmatullina L.I., Kamalova N.E. Pathophysiological significance of E-cadherin in malignant tumors. Mezhdunarodnyy zhurnal meditsiny i psikhologii = International Journal of Medicine and Psychology 2020;3(5):100–6. (In Russ.).
5. Wang M., Deng C., Yang C. et al. Unraveling temporal and spatial biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer: insights into the crucial role of immunosuppressive cells. J Transl Med 2023;21(1):794. DOI: 10.1186/s12967-023-04600-x

6. Danen E.H., de Vries T.J., Morandini R. et al. E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res* 1996;6(2): 127–31. DOI: 10.1097/00008390-199604000-00007
7. Chen Y., Zheng X., Wu C. The role of the tumor microenvironment and treatment strategies in colorectal cancer. *Front Immunol* 2021;12:792691. DOI: 10.3389/fimmu.2021.792691
8. Rodriguez F.J., Lewis-Tuffin L.J., Anastasiadis P.Z. E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826(1):23–31. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.03.002
9. Liu Y., Chen M., Wu B. TWIST1 promotes colorectal carcinoma stemness and oxaliplatin resistance by activating microfibillar-associated protein 2. *Assay Drug Dev Technol* 2023;21(5): 202–11. DOI: 10.1089/adt.2022.099
10. Oh B.Y., Kim S.Y., Lee Y.S. et al. Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition according to microsatellite instability status in colon cancer cells. *Oncotarget* 2016;7(35):57066–76. DOI: 10.18632/oncotarget.10974
11. Kawamoto A., Yokoe T., Tanaka K. et al. Radiation induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Oncol Rep* 2012;27(1):51–7. DOI: 10.3892/or.2011.1485
12. Zhang H., Steed A., Co M., Chen X. Cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, ATP and their roles in drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist* 2021;4(3):684–709. DOI: 10.20517/cdr.2021.32
13. Muralee M., Jacob A.T., K C. et al. Survival analysis using neoadjuvant rectal score in locally advanced rectal cancer patients who underwent surgery after neoadjuvant chemoradiotherapy: an ambispective study. *Cureus* 2025;17(6):e86859. DOI: 10.7759/cureus.86859
14. Azizan S., Cheng K.J., Mejia Mohamed E.H. et al. Insights into the molecular mechanisms and signalling pathways of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer: a systematic review and bioinformatic analysis of gene expression. *Gene* 2024;896:148057. DOI: 10.1016/j.gene.2023.148057
15. Christou N., Perraud A., Blondy S. et al. E-cadherin: a potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncol Lett* 2017;13(6):4571–6. DOI: 10.3892/ol.2017.6063
16. Tang Y., Durand S., Dalle S., Caramel J. EMT-inducing transcription factors, drivers of melanoma phenotype switching, and resistance to treatment. *Cancers (Basel)* 2020;12(8):2154. DOI: 10.3390/cancers12082154
17. Vandyck H.H., Hillen L.M., Bosio F.M. et al. Rethinking the biology of metastatic melanoma: a holistic approach. *Cancer Metastasis Rev* 2021;40(2):603–24. DOI: 10.1007/s10555-021-09960-8
18. Yang J., Antin P., Berx G. et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21(6):341–52. DOI: 10.1038/s41580-020-0237-9
19. Dongre A., Weinberg R.A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20(2):69–84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4
20. Bhatia S., Monkman J., Toh A.K.L. et al. Targeting epithelial-mesenchymal plasticity in cancer: clinical and preclinical advances in therapy and monitoring. *Biochem J* 2017;474(19):3269–306. DOI: 10.1042/BCJ20160782
21. Zhao Z., Rahman M.A., Chen Z.G., Shin D.M. Multiple biological functions of Twist1 in various cancers. *Oncotarget* 2017;8(12):20380–93. DOI: 10.18632/oncotarget.14608
22. He X., Chen Z., Jia M., Zhao X. Downregulated E-cadherin expression indicates worse prognosis in Asian patients with colorectal cancer: evidence from meta-analysis. *PLoS One* 2013;8(7):e70858. DOI: 10.1371/journal.pone.0070858
23. Turano M., Vicidomini R., Cammarota F. et al. The epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer progression: the emerging role of succinate dehydrogenase alterations and succinate accumulation. *Biomedicines* 2023;11(5):1428. DOI: 10.3390/biomedicines11051428
24. Luo J.W., Wang C.M., Su J.W. et al. CUL4B increases platinum-based drug resistance in colorectal cancer through EMT: A study in its mechanism. *J Cell Mol Med* 2022;26(23):5767–78. DOI: 10.1111/jcmm.17585
25. Fischer K.R., Durrans A., Lee S. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 2015;527(7579):472–6. DOI: 10.1038/nature15748
26. Tsai J.H., Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev* 2013;27(20):2192–206. DOI: 10.1101/gad.225334.113
27. Zheng X., Dai F., Feng L. et al. Communication between epithelial-mesenchymal plasticity and cancer stem cells: new insights into cancer progression. *Front Oncol* 2021;11:617597. DOI: 10.3389/fonc.2021.617597
28. Song Y., Deng Z., Sun H. et al. Predicting tumor repopulation through the gene panel derived from radiation resistant colorectal cancer cells. *J Transl Med* 2023;21(1):390. DOI: 10.1186/s12967-023-04260-x
29. Yu W., Yang L., Li T., Zhang Y. Cadherin signaling in cancer: its functions and role as a therapeutic target. *Front Oncol* 2019;9:989. DOI: 10.3389/fonc.2019.00989
30. Lu J., Kornmann M., Traub B. Role of epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2023;24(19):14815. DOI: 10.3390/ijms241914815
31. Vermani L., Kumar R., Kannan R.R. et al. Expression pattern of ALDH1, E-cadherin, Vimentin and Twist in early and late onset sporadic colorectal cancer. *Biomark Med* 2020;14(14):1371–82. DOI: 10.2217/bmm-2020-0206
32. Fontana F., Sommariva M., Anselmi M. et al. Differentiation states of phenotypic transition of melanoma cells are revealed by 3D cell cultures. *Cells* 2024;13(2):181. DOI: 10.3390/cells13020181
33. Mirea M.A., Eckensperger S., Hengstschläger M., Mikula M. Insights into differentiation of melanocytes from human stem cells and their relevance for melanoma treatment. *Cancers (Basel)* 2020;12(9):2508. DOI: 10.3390/cancers12092508
34. Al Khatib A.M., Mărgăritescu C., Tăiescu O. et al. Immunoeexpression of E-cadherin, Snail and Twist in colonic adenocarcinomas. *Rom J Morphol Embryol* 2019;60(2):531–6. PMID: 31658326

Вклад авторов

Е.А. Пасечникова, А.Ю. Георгиева: разработка концепции и дизайна исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка и редактирование текста, проведение статистического анализа;
В.Н. Бодня, Д.В. Кадомцев: проведение статистического анализа, редактирование статьи;
В.А. Порханов: подготовка и редактирование статьи;
А.А. Веревкин, С.Д. Максименко: гистологическая верификация диагноза, оценка клинико-морфологических данных, иммуногисто-химическое исследование, редактирование статьи.

Author's contributions

E.A. Pasechnikova, A.Yu. Georgieva: concept and design, acquisition, analysis and interpretation of data, manuscript drafting and revising, statistical analysis;
V.N. Bodnya, D.V. Kadomtsev: conducting statistical analysis, editing the article;
V.A. Porkhanov: preparation and editing of the article;
A.A. Verevkin, S.D. Maksimenko: histological verification of the diagnosis, assessment of clinical and morphological data, immunohistochemical examination, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Пасечникова / E.A. Pasechnikova: <https://orcid.org/0000-0001-7337-4618>
А.Ю. Георгиева / A.Yu. Georgieva: <https://orcid.org/0000-0001-5166-047X>
В.Н. Бодня / V.N. Bodnya: <https://orcid.org/0000-0003-3169-9558>
Д.В. Кадомцев / D.V. Kadomtsev: <https://orcid.org/0000-0001-9610-5525>
В.А. Порханов / V.A. Porkhanov: <https://orcid.org/0000-0003-0572-1395>
А.А. Веревкин / A.A. Verevkin: <https://orcid.org/0000-0002-4159-2618>
С.Д. Максименко / S.D. Maksimenko: <https://orcid.org/0000-0003-2515-9125>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов правил биоэтики. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, протоколы №1/10, 2/10 от 05.10.2020. Все пациенты подписали информированное согласие на использование образцов в исследовательских целях.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study was approved by the Ethics Committee of the Kuban State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, protocols No. 1/10, 2/10 dated 05.10.2020. All patients signed informed consent for the use of samples for research purposes.

Статья поступила: 24.06.2025. Принята к публикации: 18.08.2025. Опубликовано онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 24.06.2025. Accepted for publication: 18.08.2025. Published online: 25.09.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-83-91>

Детекция минимальной остаточной болезни после индукционной химиотерапии и ауто-ТГСК и ее клиническое значение при множественной миеломе

С.В. Чулкова^{1,2}, Н.А. Купрышина¹, А.А. Семенова¹, О.П. Колбаская¹, Г.С. Тумян¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Пироговский Университет); Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Введение. Исследование минимальной остаточной болезни (МОБ) – необходимый этап детального анализа персистенции опухолевого клона в костном мозге больных множественной миеломой (ММ), что важно для оценки глубины ремиссии на фоне лечения. Оценка МОБ может быть полезной для построения прогноза ММ и выбора тактики ведения больных.

Цель исследования – оценка частоты МОБ и ее прогностической значимости у больных ММ в процессе лечения.

Материалы и методы. В исследование включены 56 больных ММ, средний возраст которых составлял $54,9 \pm 1,3$ года. Все больные получали индукционную химиотерапию (ИХТ), которую проводили по схеме Vrd. После ИХТ и через 100 дней после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) оценивали статус МОБ. Оценка МОБ-статуса выполнена методом многоцветной проточной цитометрии (FACSCanto II, программа Kaluza Analysis v2.1, США). Моноклональные антитела: CD45, CD19, CD27, CD56, CD28, CD38, CD117, CD19, CD81, легкие цепи иммуноглобулина κ/λ , 7AD (Becton Dickinson, США).

Результаты. Частота МОБ-негативного статуса после ИХТ составила 35,7 %, после ауто-ТГСК – 56,7 %. Отмечено снижение количества аномальных плазматических клеток (ПК) в костном мозге в 1,3 раза по сравнению с этапом ИХТ. Установлена конверсия МОБ-позитивных случаев на фоне лечения. В группе с содержанием ПК в костном мозге после ИХТ от 0,01 до 0,1 % МОБ-статус изменился после ауто-ТГСК и стал негативным у 53 % пациентов. При наличии более 0,01 % ПК после ИХТ частота прогрессирования возросла более чем в 2 раза и составила 50,0 % ($p < 0,05$). Среднее число ПК у пациентов без прогрессирования болезни, выявляемых после ауто-ТГСК, было значительно меньше – 0,02 % против 0,31 %, $p < 0,05$.

Заключение. Частота МОБ-негативного статуса на этапе ИХТ и после ауто-ТГСК отличается, поэтому важны несколько точек контроля. После аутоТГКС наблюдают конверсию МОБ-позитивных случаев в негативные. Прогрессирование ММ наблюдалось достоверно чаще при МОБ-позитивном статусе. Мониторинг МОБ может помочь в выборе кандидатов на присоединение поддерживающего лечения ММ.

Ключевые слова: множественная миелома, ауто-ТГСК, минимальная остаточная болезнь, проточная цитометрия

Для цитирования: Чулкова С.В., Купрышина Н.А., Семенова А.А. и др. Детекция минимальной остаточной болезни после индукционной химиотерапии и ауто-ТГСК и ее клиническое значение при множественной миеломе. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(3):83–91.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-83-91>

Detection of minimal residual disease after induction chemotherapy and autologous HSCT and its clinical significance in multiple myeloma

Svetlana V. Chulkova^{1,2}, Natalia A. Kupriyushina¹, Anastasiya A. Semenova¹, Olga P. Kolbatskaya¹, Gayane S. Tumyan¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia (Pirogov University); 1a Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Svetlana Vasilievna Chulkova chulkova@mail.ru

Background. Minimal residual disease (MRD) study is a necessary step for detailed analysis of tumor clone persistence in bone marrow of patients with multiple myeloma (MM), which is important for assessing the depth of remission during treatment. MRD assessment can be useful for building a prognosis of MM and choosing patient management tactics.

Aim. To assess the frequency of MRD and its prognostic significance in patients with MM during treatment.

Materials and methods. The study included 56 patients with MM, the average age of which was 54.9 ± 1.3 years. All patients received induction chemotherapy, which was carried out according to the Vrd regimen. After induction therapy and 100 days after autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT), MRD status was assessed. MRD status was assessed by multicolor flow cytometry (FACSCanto II, Kaluza Analysis v2.1 software, USA). Monoclonal antibodies: CD45, CD19, CD27, CD56, CD28, CD38, CD117, CD19, CD81, immunoglobulin light chains kappa/lambda, 7ADD (Becton Dickinson, USA).

Results. The frequency of MRD-negative status after induction therapy was 35.7 %, after auto-HSCT – 56.7 %. A decrease in the number of abnormal plasma cells (PC) in the bone marrow by 1.3 times was noted compared to the induction therapy stage. Conversion of MRD-positive cases was established during treatment. In the group with the PC content in the bone marrow after induction therapy more than 0.01 %, but less than 0.1 %, the MRD status changed after auto-HSCT and became negative in 53 % of patients. In the presence of PC more than 0.01 % after induction, the progression rate increased more than 2-fold and was 50.0 % ($p < 0.05$). The average number of PCs in patients without disease progression detected after auto-HSCT was significantly lower: 0.02 % versus 0.31 %, $p < 0.05$.

Conclusion. The frequency of MRD-negative status at the stage of induction therapy and after auto-HSCT differs, so several control points are important. After auto-HSCT, there is a conversion of MRD-positive cases to negative ones. Progression of MM was observed more often with MRD-positive status. Monitoring of MRD can help in selecting candidates for joining maintenance treatment of MM.

Keywords: multiple myeloma, autologous hematopoietic stem cell transplantation, minimal residual diseases, flow cytometry

For citation: Chulkova S.V., Kupriyushina N.A., Semenova A.A. et al. Detection of minimal residual disease after induction chemotherapy and autologous HSCT and its clinical significance in multiple myeloma. *Rossiiskij bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(3):83–91. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-3-83-91>

Введение

Множественная миелома (ММ) составляет около 13 % среди опухолей гемопоэтической природы [1]. Миелома характеризуется пролиферацией в костном мозге и экстрамедуллярных очагах патологического клона плазматических клеток (ПК), которые продуцируют моноклональный парапротеин. Заболеваемость ММ варьирует и составляет от 3 до 6 случаев на 100 тыс. населения. По данным 2021 г., в Российской Федерации зарегистрирован 3831 новый случай ММ, а грубый показатель заболеваемости составил 2,63 случая на 100 тыс. населения [2].

Лечение ММ на современном этапе представляет собой проведение высокодозной химиотерапии (ХТ) с использованием современных лекарственных препаратов (талидомида, леналидомида, бортезомиба) с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) [3–5]. Такая стратегия позволяет практически до 7 лет увеличить медиану общей выживаемости больных с ММ стандартного риска [3, 6, 7]. Тем не менее после лечения часто наблюдаются рецидивы, что обуслов-

лено наличием остаточного клона опухолевых клеток в костном мозге (минимальная остаточная болезнь, МОБ), который рутинные методы диагностики не обнаруживают. Вследствие этого важным этапом в лечении ММ становится определение МОБ, что помогает понять глубину ремиссии и в дальнейшем открывает возможности стратифицировать больных на группы риска возврата болезни. Оценку МОБ проводят на основании определения аберрантного иммунофенотипа ПК, который не характерен для нормальных клеток [8].

Определение МОБ-статуса выполняют на этапе индукционной ХТ (ИХТ) и через 100 дней после ауто-ТГСК. По данным ряда исследований, достижение МОБ-негативного статуса коррелирует с хорошими показателями выживаемости больных ММ [8]. В настоящей работе представлен собственный опыт определения МОБ-статуса и оценка его влияния на результаты лечения ММ.

Цель исследования — оценка частоты МОБ и ее прогностической значимости у больных ММ в процессе лечения.

Материалы и методы

Исследование костного мозга

Исследование костного мозга пациентов с ММ проведено в лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Подсчет миелограммы выполняли 2 независимых врача-морфолога на световом микроскопе Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Германия). Миелокарициты подсчитывали на гематологическом анализаторе ABX Micros ES 60 (Horiba ABX, Франция). Процентный подсчет клеток пунктата проводили по методу М.И. Аринкина (подробнее см. в [9]). Иммунологическое исследование выполнено методом 8-цветной проточной цитофлуориметрии (FACSCanto II, Becton Dickinson, США) с использованием панели моноклональных антител (Becton Dickinson, США) для плазмоклеточных опухолей, рекомендованной европейским консорциумом EuroFlow в 2012 г.

Пробоподготовку проводили по стандартной методике протокола А.С. Rawstron и соавт. [7].

После получения суспензии клеток костного мозга к образцу прибавляли моноклональные антитела согласно используемой панели антител (табл. 1). Инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте, от несвязавшихся антител отмывали

раствором CellWash. Анализ и учет реакции проводили на 3–5 млн событий.

По параметрам FSC-A (прямое светорассеяние) против SSC-A (боковое светорассеяние) выполняли гейтирование для выделения синглетов. Обязательным этапом являлось исключение нежизнеспособных клеток на основании ядерного красителя 7-ADD. Гейтирование для выделения всей популяции ПК проводили по маркерам CD38 и CD138. Выделяли все события CD138⁺ и CD38⁺, включая ПК даже с низкой экспрессией антигена.

Затем проводили разделение популяции опухолевых и нормальных ПК. Миеломные клетки имеют высокие характеристики FSC и/или SSC, не экспрессируют CD45-, CD19-, CD27-антигены и характеризуются наличием гомогенной экспрессии CD56 или CD28. Плотность экспрессии маркера CD38 ниже, чем на нормальных. Учитывали не менее 2 признаков aberrантности.

На рис. 1 представлена популяция опухолевых ПК. После того как популяция ПК с aberrантным иммунофенотипом обнаружена, подсчитывали процент клеток с aberrантным фенотипом от всех клеток образца. Позитивными по МОБ-статусу считали образцы, в которых процент ПК в костном мозге составлял 0,01 и более.

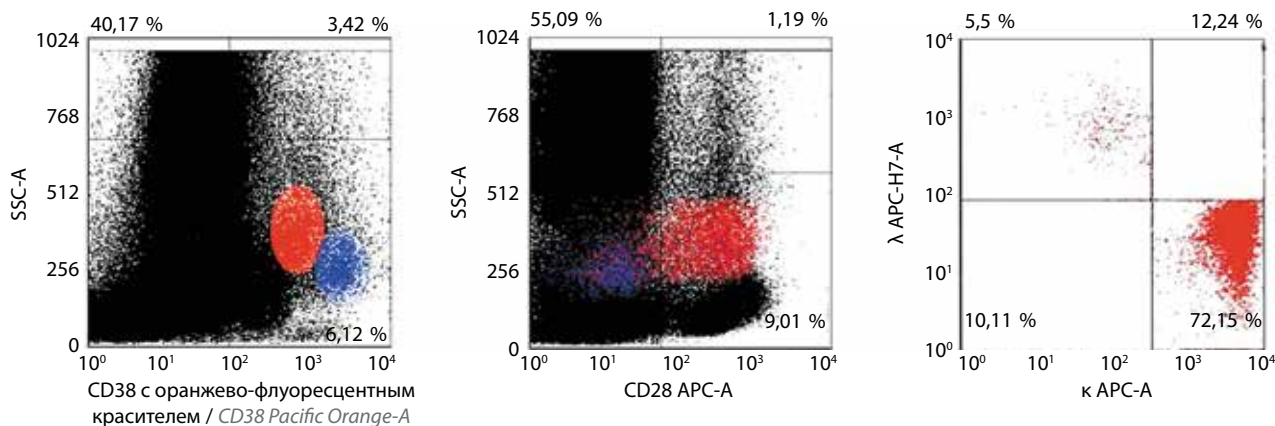


Рис. 1. Пример опухолевого и нормального клона плазматических клеток. Популяции клеток: красный — с aberrантным фенотипом, синий — с нормальным фенотипом. Моноклональность по κ -типу

Fig. 1. Example of tumor and normal clone of plasma cells. Cell populations: red — with aberrant phenotype, blue — with normal phenotype. Kappa type monoclonality

Таблица 1. Панель антител для иммунофенотипирования множественной миеломы

Table 1. Antibody panel for immunophenotyping of multiple myeloma

Проба Sample	РacBlu/450	РacOr/V500	FITC	PE	PE-Cy5	Pe-Cy7	APC	APC-H7
1	CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	κ	λ
2	CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81

Характеристика больных

В работу включены 56 больных ММ, средний возраст которых составил $54,9 \pm 1,3$ года. Все больные получали ИХТ, которая проводилась по схеме Vrd, от 1 до 5 циклов, медиана — 3,0. После ИХТ у каждого больного оценивали статус МОБ. Далее через 100 дней после ауто-ТГСК повторно выполняли анализ МОБ.

Мобилизацию стволовых клеток выполняли в стабильной фазе гемопоэза гранулоцитарным колоние-стимулирующим фактором ($10\text{--}16$ мкг/кг/день). Сбор осуществляли на сепараторе клеток крови Amicus ((Baxter, США). Для проведения 1 ауто-ТГСК содержание в трансплантате $CD34^+$ -клеток составляло не менее 2×10^6 /кг.

Полная ремиссия (отсутствие секреции моноклонального парапротеина в моче и сыворотке, нормальное соотношение свободных легких цепей, отсутствие внескостномозговых компонентов и количество ПК $<5\%$) достигнута у 66,0 % ($n = 33$) пациентов. У 14,0 % ($n = 7$) отмечен очень хороший частичный ответ на ИХТ (секреция моноклонального парапротеина в моче и сыворотке или редукция 90 % и более парапротеина в сыворотке и уровень М-протеина в моче <100 мг/сут), а у 4,0 % наблюдали частичную ремиссию.

Результаты

Проведен анализ частоты встречаемости аномально экспрессирующихся антигенов на ПК. Аберрантное отсутствие В-клеточного антигена CD19 отмечено в 91,1 % случаев, CD45 не присутствовал на миеломных клетках в 66,7 %, CD56 экспрессировался в 74,5 % случаев. Аномальная экспрессия CD28 обнаруживалась в 43,0 % случаев, а аномальное отсутствие или сниженная экспрессия антигена CD27 — в 60,0 % случаев.

Анализ оценки МОБ-статуса у больных ММ выполнен на 2 этапах. На первом этапе МОБ оценили после ИХТ. Количество образцов с МОБ-негативным

статусом составило 35,7 %. Пример МОБ-негативного статуса после ИХТ представлен на рис. 2.

Следует отметить, что у 66 % пациентов отмечен полный ответ на ИХТ. В среднем количество аномальных ПК составило $1,02 \pm 0,5$ % ($n = 56$), медиана — 0,037. Разброс процента ПК после ИХТ представлен в табл. 2. Как видно из данных таблицы, МОБ не выявляли в 21,4 % образцов, а в 14,5 % случаев количество аномальных ПК варьировало от 0,0011 до 0,008 %. В 61,3 % образцов выявлены аномальные ПК в количестве 0,01–4,3 %, а в 1 случае обнаружен 31 % ПК. На рис. 3 представлен МОБ-позитивный случай после ИХТ.

Таблица 2. Количество аномальных плазматических клеток (ПК) в костном мозге после индукционной терапии

Table 2. Number of abnormal plasma cells (PCs) in bone marrow after induction therapy

Степень Degree	Количество образцов, $n = 56$, абс. (%) Number of samples, $n = 56$, abs. (%)	Количество ПК, % Number of PCs, %
10^{-5}	12 (21,4)	0
10^{-3}	8 (14,5)	0,0011–0,008
10^{-2}	35 (61,3)	0,01–4,3
—	1 (1,8)	31,0

После проведения ауто-ТГСК результаты оценки миеломных клеток в костном мозге были следующими. Количество МОБ-негативных случаев составило 56,1 %. Среднее количество аномальных ПК составило $0,19 \pm 0,08$ %, медиана — 0,005 ($n = 41$). По сравнению с количеством миеломных клеток на этапе ИХТ их количество статистически значимо уменьшилось в 1,3 раза ($p = 0,017$) (табл. 3).

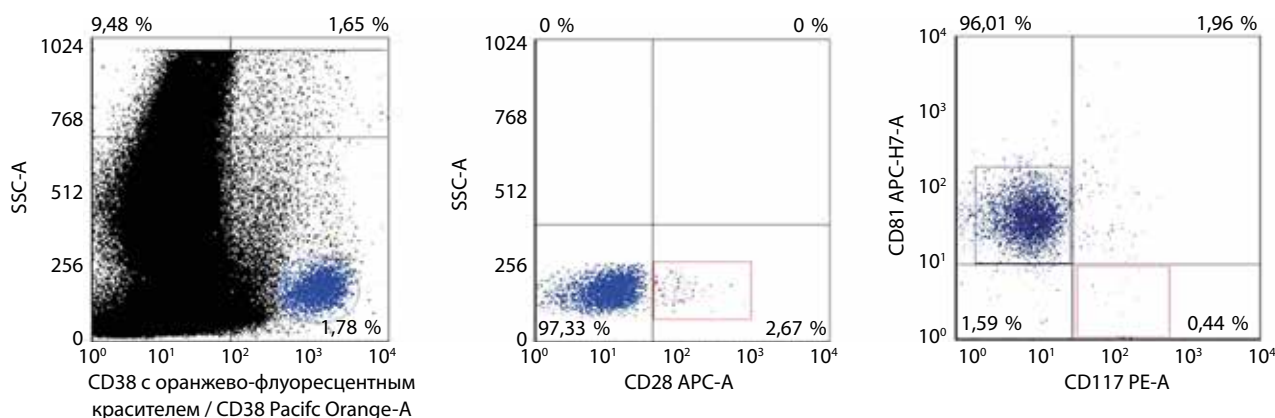


Рис. 2. Пример негативного статуса минимальной остаточной болезни у больного Г. после индукционной терапии

Fig. 2. Example of minimal residual disease negative status in patient G. after induction therapy

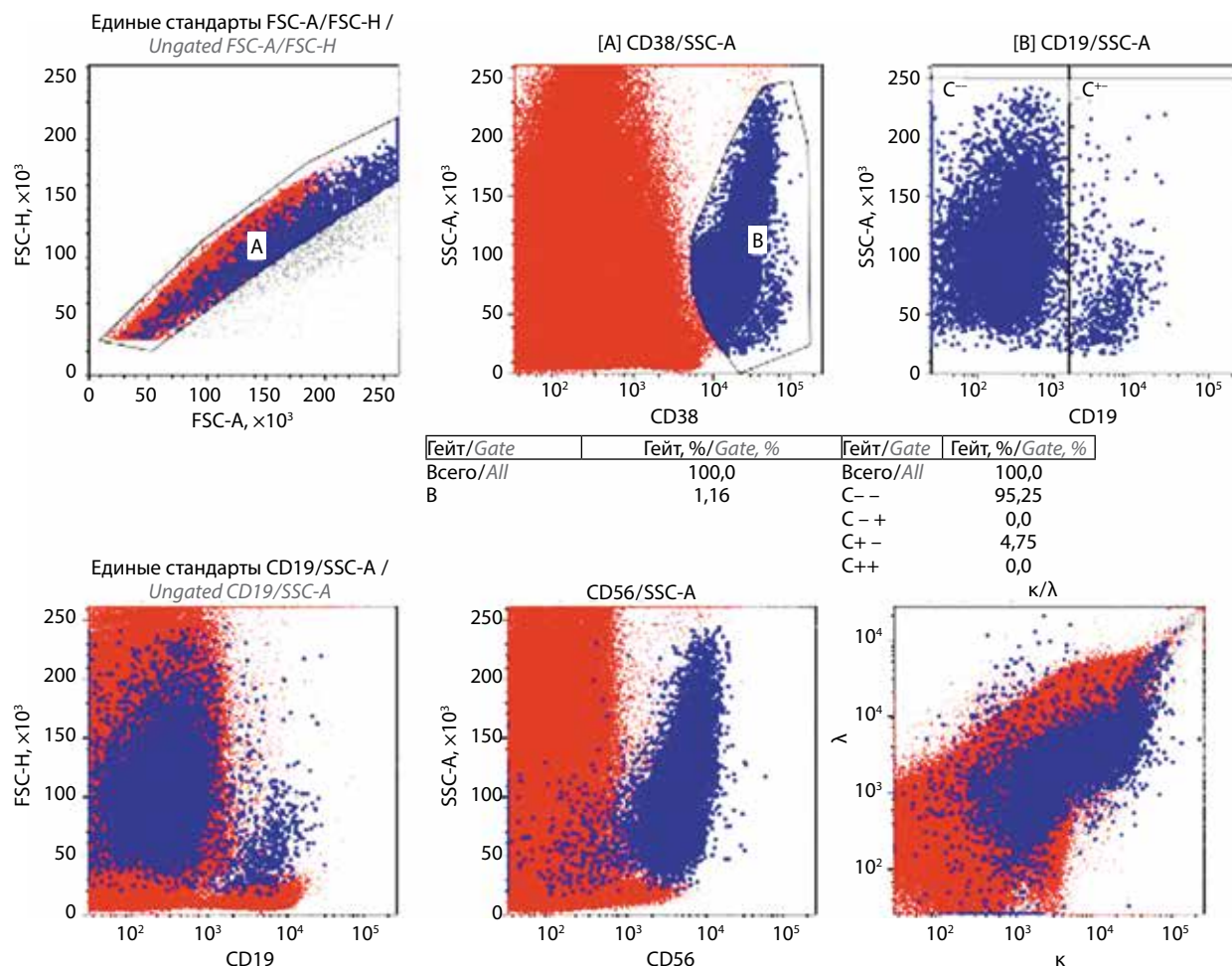


Рис. 3. Пример цитогрaмм позитивного статуса минимальной остаточной болезни у больного Д. Популяция аномальных плазматических клеток выделена синим цветом, имеет фенотип CD19⁺CD56⁺CD27⁺CD45⁺

Fig. 3. Example of cytograms of minimal residual disease positive status in patient D. The population of abnormal plasma cells is highlighted in blue, has the phenotype CD19⁺CD56⁺CD27⁺CD45⁺

Таблица 3. Содержание аномальных плазматических клеток у пациентов до трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) и на 100-й день лечения (n = 41)

Table 3. Content of abnormal plasma cells in patients before autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) and on the 100th day of treatment (n = 41)

Количество миеломных клеток в костном мозге Number of myeloma cells in bone marrow	Среднее, % Mean, %	Стандартное отклонение Standard deviation	Стандартная ошибка среднего Standard mean error	p
После индукционной химиотерапии After induction chemotherapy	0,279	0,592	0,09	0,017
После аутоТГСК After auto-HSCT	0,198	0,542	0,08	

Нужно отметить, что у 15 пациентов, которым проведена ауто-ТГСК и выполнен контроль аномальных ПК после трансплантации, сохранился МОБ-негативный статус. Дополнительно 8 пациентов приобрели МОБ-негативный статус на 100-й день после

ауто-ТГСК, у 2 пациентов количество ПК уменьшилось на порядок. На рис. 4 представлен пример МОБ-негативного статуса.

Среди МОБ-негативных образцов после трансплантации число аномальных ПК в 48,8 % случаев

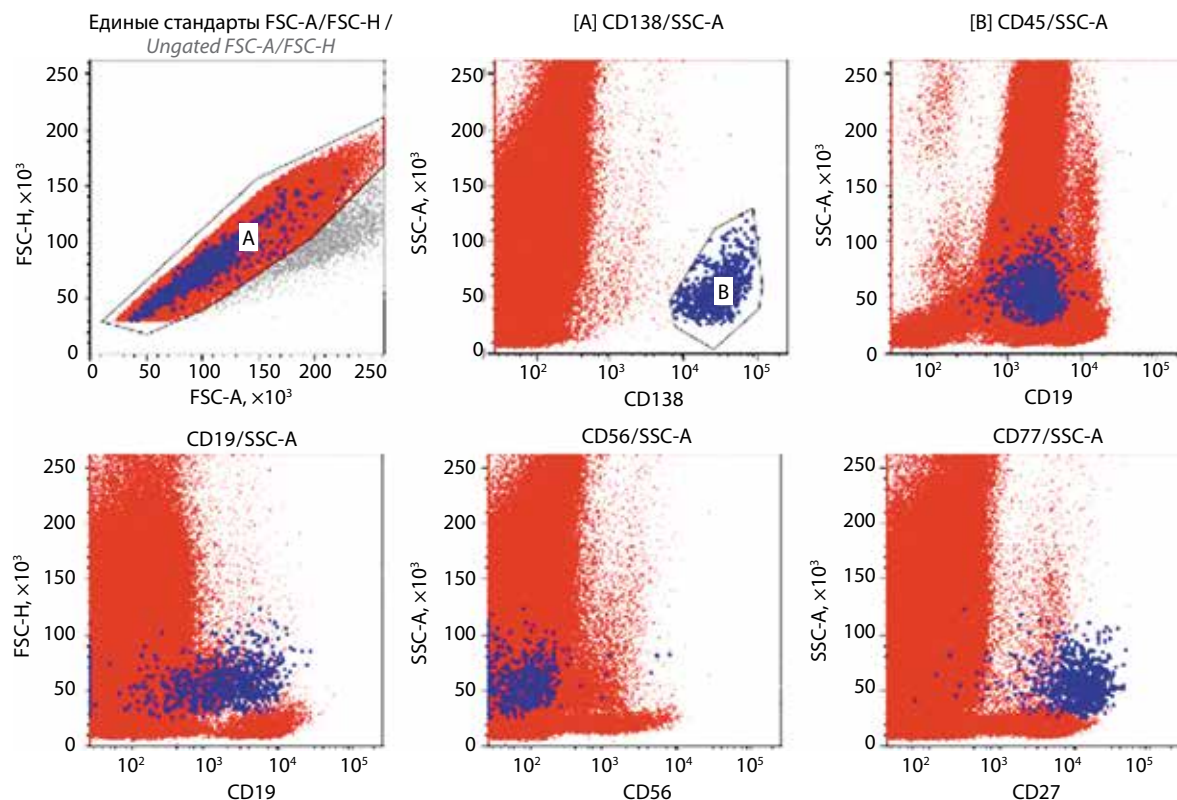


Рис. 4. Пример цитограм негативного статуса минимальной остаточной болезни у больного П. после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток. Большинство нормальных плазматических клеток — гейт В (синий цвет) иммунофенотипа $CD19^+CD56^-CD27^+$

Fig. 4. Example of cytograms of minimal residual disease negative status in patient P. after auto-HSCT. The most normal plasma cells gate B (in blue color) immunophenotype $CD19^+CD56^-CD27^+$

составляло не более 0,0 %, а в 13,5 % образцов обнаруживались от 0,0011 до 0,008 % клеток (табл. 4).

Таблица 4. Количество аномальных плазматических клеток (ПК) в костном мозге после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

Table 4. Number of abnormal plasma cells (PCs) in bone marrow after autologous hematopoietic stem cell transplantation

Степень Degree	Количество образцов, абс. (%) Number of samples, abs. (%)	Количество ПК, % Number of PCs, %
10^{-5}	20 (48,8)	0,0
10^{-3}	4 (9,8)	0,0011–0,008
10^{-2}	17 (41,4)	0,01–2,01

Мы отдельно оценили случаи, которые характеризовались содержанием ПК после ИХТ более 0,01 %, но меньше 0,1 % (табл. 5). Оказалось, что после проведения ауто-ТГСК у 53 % пациентов МОБ-статус изменился и стал негативным. Число ПК $<0,01$ % мы наблюдали в 26,7 % образцов, такое же количество случаев характеризовалось содержанием менее чем 0,001 % ПК в костном мозге. Необходимо отме-

тить, что в 7 случаях МОБ-негативность, достигнутая после ауто-ТГСК, сохранилась через 3–6–12 мес контрольного исследования.

Таблица 5. Конверсия статуса минимальной остаточной болезни после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

Table 5. Conversion of minimal residual disease status after autologous hematopoietic stem cell transplantation

Количество миеломных клеток в костном мозге Number of myeloma cells in bone marrow	Частота выявления, абс. (%) Frequency of detection, abs. (%)
Пороговый уровень: Threshold level:	
$<0,001$	4 (26,7)
$<0,01$	4 (26,7)
$<1,0$	7 (46,7)
Всего Total	15 (100,0)

Затем мы проанализировали результаты лечения ММ в зависимости от наличия МОБ на этапе ИХТ и после ауто-ТГСК (табл. 6). При негативном статусе

Таблица 6. Взаимосвязь наличия минимальной остаточной болезни (МОБ) в костном мозге после индукционной терапии и результатов лечения множественной миеломы

Table 6. Relationship between the presence of minimal residual disease (MRD) in bone marrow after induction therapy and the treatment results of multiple myeloma

МОБ-статус Status MRD	Число пациентов с МОБ, абс. (%) Number of patients with MRD, abs. (%)		Итого Total	p
	без прогрессирования no progression	прогрессирование progression		
Негативный Negative	16 (80,0)	4 (20,0)	20 (100,0)	0,02
Позитивный Positive	15 (50,0)	15 (50,0)	30 (100,0)	
Всего Total	31 (62,0)	19 (38,0)	50 (100,0)	

Таблица 7. Частота прогрессирования в 2 группах больных (абс. (%)) в зависимости от статуса минимальной остаточной болезни (МОБ) до и после лечения

Table 7. Frequency of progression in 2 groups of patients (abs. (%)) depending on minimal residual disease (MRD) status before and after treatment

Группа пациентов Group of patients	МОБ-статус Status MRD		Итого Total	p
	без прогрессирования no progression	прогрессирование progression		
1-я группа 1 st group	18 (85,7)	3 (14,3)	21 (100,0)	0,032
2-я группа 2 nd group	8 (53,3)	7 (46,7)	15 (100,0)	
Всего Total	26 (72,2)	10 (27,8)	36 (100,0)	

МОБ после ИХТ прогрессирование отмечено в 20,0 % случаев ($n = 4$). При наличии в костном мозге более 0,01 % аномальных ПК частота прогрессирования возрастала более чем в 2 раза и составила 50,0 % ($n = 15$), различия были статистически значимыми ($p = 0,02$).

Практически аналогичная картина сохранялась при МОБ-негативном статусе после ауто-ТГСК — у 18,2 % МОБ-негативных пациентов отмечено прогрессирование болезни против 46,7 % при МОБ-позитивности. Среднее число аномальных ПК у пациентов без прогрессирования ММ, выявляемых после ауто-ТГСК, было значительно меньше и составляло $0,02 \pm 0,01$ % ($n = 26$) против $0,31 \pm 0,19$ % ($n = 11$) при прогрессировании болезни. Различия были статистически значимыми ($p = 0,021$).

Проводя дальнейший анализ, мы выделили 2 группы больных. Первая — пациенты, у которых до проведения ауто-ТГСК и после таковой определялся МОБ-негативный статус, а также те, у кого произошла конверсия и МОБ-статус стал негативным после трансплантации. Вторая группа — пациенты, у кото-

рых МОБ-статус и на этапе ИХТ, и после ауто-ТГСК был позитивным. Сравнение результатов лечения в этих 2 группах больных представлено в табл. 7. Как можно видеть, наилучшими результатами лечения характеризовалась 1-я группа, в которой частота прогрессирования составила 14,3 %. Во 2-й группе практически в 50 % случаев наблюдалось прогрессирование, что практически в 3,2 раза выше, чем в 1-й группе ($p = 0,032$).

Обсуждение

В лечении ММ одним из важных этапов становится определение клона миеломных клеток в костном мозге на фоне проводимого лечения, что позволяет понять его эффективность и оценить перспективу дальнейшей терапии. В нашем исследовании выполнена оценка МОБ в костном мозге больных ММ в процессе лечения в 2 точках. Мониторинг осуществляли после циклов ИХТ по схеме Vrd и затем после трансплантации костного мозга через 100 дней.

Сообщается, что проведение ИХТ приводит к более стойким ремиссиям с достижением полного ответа и положительно отражается на выживаемости больных [10, 11]. По результатам нашего исследования мы установили, что после ИХТ у 66,0 % пациентов достигнута полная ремиссия, а у 14,0 % отмечен очень хороший частичный ответ. Оценка популяции миеломных клеток в костном мозге показала, что в дальнейшем, после проведения ауто-ТГСК, количество МОБ-негативных случаев увеличилось до 56,1 %. При этом среднее количество миеломных клеток после ауто-ТГСК статистически значимо уменьшилось в 1,3 раза по сравнению с этапом ИХТ. Принимая во внимание эти данные, можно констатировать, что оценка МОБ — это дополнительный шаг в мониторинге эффективности лечения.

Важным наблюдением в нашей работе стала конверсия МОБ-положительных случаев на фоне лечения. Мы изучили случаи, которые характеризовались содержанием от 0,01 до 0,1 % ПК в костном мозге после ИХТ. В этой группе МОБ-статус изменился после ауто-ТГСК и стал негативным у 53 % пациентов. При этом 26,7 % образцов костного мозга характеризовались количеством ПК $<0,001$ % и в таком же числе случаев их количество было $<0,01$ %. В 7 случаях МОБ-негативность, которая была достигнута после ауто-ТГСК, сохранилась через 3 мес контрольного исследования. Эти факты демонстрируют, что МОБ-статус после ИХТ не может рассматриваться в отдельности от дальнейших этапов лечения. При этом пороговый уровень при оценке МОБ не может быть ниже 0,01 % и в перспективе — 0,001 %. Дело в том, что случаи МОБ-негативности, характеризующиеся числом клеток $<0,001$ %, наиболее перспективны в отношении благоприятного течения болезни и более стойкой ремиссии, что показал следующий этап нашей работы.

Мы провели оценку результатов лечения ММ в зависимости от наличия МОБ на этапе ИХТ и после ауто-ТГСК. При наличии $>0,01$ % миеломных клеток в костном мозге после ИХТ частота прогрессирования статистически значимо возрастала более чем

в 2 раза и составила 50,0 %. Практически аналогичная картина сохранялась при МОБ-положительном статусе после ауто-ТГСК. При этом среднее число миеломных клеток у пациентов без прогрессирования болезни после ауто-ТГСК было значительно меньше: 0,02 % против 0,31 %. Эти результаты в сочетании с данными литературы подчеркивают важность МОБ-негативности на фоне лечения ММ, поскольку имеется статистически значимая связь с прогнозом заболевания, и мы видим, что прогрессирование болезни у пациентов развивается чаще при наличии МОБ-положительности [12].

Проведенный нами анализ в пределах 2 групп дополнительно показал, что преимущество имеют пациенты, у которых до ауто-ТГСК и после ее проведения определялся МОБ-негативный статус, а также те, у кого произошла конверсия из положительного статуса после трансплантации. Частота прогрессирования в этой группе была в 3 раза ниже. Наши результаты не противоречат другим работам, в которых приведены данные оценки МОБ-статуса в качестве прогностического фактора при ММ [13]. Сообщается, что выживаемость без прогрессирования у МОБ-негативных пациентов после ауто-ТГСК была статистически значимо выше в 2 раза, чем у МОБ-положительных больных [14].

Заключение

Оценка МОБ в процессе проведения лечения ММ позволяет составить представление о клоне аномальных ПК, их резистентности в процессе лечения, что влияет на выбор тактики ведения пациентов, например в пользу поддерживающей терапии. По результатам исследования пороговый уровень определения аномальных ПК в костном мозге методом проточной цитометрии не может быть ниже 0,01 % и в перспективе — 0,001 %. Стратификация на группы в зависимости от статуса МОБ, который должен оцениваться в динамике, может помочь наиболее точно прогнозировать течение болезни. Сохранение МОБ-положительности на всех этапах терапии ММ служит отрицательным прогностическим признаком, поскольку в этом случае частота прогрессирования увеличивается в несколько раз.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12):e538–48. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5
2. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
3. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shachzadova. Moscow: MNIОI im. P.A. Gertsena — filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2021. 252 p. (In Russ.).
4. Rajkumar S.V. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2016;91(7):719–34. DOI: 10.1002/ajh.24402
5. Rocchi S., Zannetti B.A., Marconi G., Lanza F. Multiple myeloma: the role of autologous stem cell transplantation

- in the era of immunotherapy. *Cells* 2024;13(10):853. DOI: 10.3390/cells13100853
5. Ricciuti G., Falcone A., Cascavilla N. et al. Autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Panminerva Med* 2020;62(4):220–4. DOI: 10.23736/S0031-0808.20.04114-2
6. Bashir Q., Braunstein M., Buck T. et al. Overcoming barriers to autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: recommendations from a multidisciplinary roundtable discussion. *Transplant Cell Ther* 2023;29(11):666–73. DOI: 10.1016/j.jct.2023.08.028
7. Rawstron A., Orfao A., Beksac M. et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93(3):431–8. DOI: 10.3324/haematol.11080
8. Munshi N.C., Avet-Loiseau H., Anderson K.C. et al. A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma. *Blood Adv* 2020;4(23):5988–99. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002827
9. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Морфология клеток костного мозга в норме и патологии, интерпретация миелограмм. М.: Триада, 2018. 245 с.
- Lugovskaya S.A., Pochtár M.E. Morphology of bone marrow cells in norm and pathology, interpretation of myelograms. Moscow: Triada, 2018. 245 p. (In Russ.).
10. Kristinsson S.Y., Landgren O., Dickman P.W. et al. Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *J Clin Oncol* 2007;25(15):1993–9. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.0100
11. Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A. et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111(5):2516–20. DOI: 10.1182/blood-2007-10-116129
12. Bertamini L., D'Agostino M., Gay F. MRD Assessment in multiple myeloma: progress and challenges. *Curr Hematol Malig Rep* 2021;16(2):162–71. DOI: 10.1007/s11899-021-00633-5
13. Mina R., Oliva S., Boccadoro M. Minimal residual disease in multiple myeloma: state of the art and future perspectives. *J Clin Med* 2020;9(7):2142. DOI: 10.3390/jcm9072142. Erratum in: *J Clin Med* 2020;9(8):E2630. DOI: 10.3390/jcm9082630
14. Paiva B., Vidriales M., Cervero J. et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 2008;112(10):4017–23. DOI: 10.1182/blood-2008-05-159624

Вклад авторов

С.В. Чулкова: анализ данных, написание текста рукописи, работа с литературой, перевод;
Н.А. Купрышина, О.П. Колбаская: получение и анализ данных;
А.А. Семенова, Г.С. Тумян: разработка дизайна исследования, анализ рукописи, сбор данных.

Author's contributions

S.V. Chulkova: data analysis, manuscript writing, literature review, translation;
N.A. Kupryshina, O.P. Kolbatskaya: data collection and analysis;
A.A. Semenova, G.S. Tumyan: study design, manuscript analysis, data collection.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>
Н.А. Купрышина / N.A. Kupryshina: <https://orcid.org/0000-0001-8509-0954>
А.А. Семенова / A.A. Semenova: <https://orcid.org/0000-0003-4951-3053>
О.П. Колбаская / O.P. Kolbatskaya: <https://orcid.org/0000-0001-8493-9012>
Г.С. Тумян / G.S. Tumyan: <https://orcid.org/0000-0002-5771-4413>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без финансовой поддержки.

Funding. The work was completed without financial support.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Пациенты подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information.

Статья поступила: 21.03.2025. Принята к публикации: 18.08.2025. Опубликовано онлайн: 25.09.2025.

Article submitted: 21.03.2025. Accepted for publication: 18.08.2025. Published online: 25.09.2025.



К юбилею Михаила Валентиновича Киселевского

To mark the anniversary of Mikhail Valentinovich Kiselevsky

21 августа исполнилось 70 лет известному российскому ученому Михаилу Валентиновичу Киселевскому, доктору медицинских наук, профессору, главному редактору «Российского био-терапевтического журнала».

М.В. Киселевский – один из ведущих онкоиммунологов страны. Под его руководством разрабатываются и совершенствуются методы биотерапии злокачественных образований. Благодаря его усилиям успешно проведены клинические исследования различных вариантов адоптивной иммунотерапии онкологических больных, позволившие существенно расширить область ее применения. В течение многих лет Михаил Валентинович уделяет особое внимание созданию биоимплантов и изучению механизмов иммунной патологии при тяжелых заболеваниях, таких как сепсис и полиорганная недостаточность. Научные

интересы М.В. Киселевского охватывают различные фундаментальные аспекты иммунологии, в частности механизмы противоопухолевого иммунитета. Результаты его многолетних исследований нашли отражение в более чем 500 научных публикациях, в том числе 8 монографиях и 33 патентах.

М.В. Киселевский с 1994 г. возглавляет лабораторию клеточного иммунитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Он заслуженный деятель науки Российской Федерации, лауреат премии Правительства России в области науки и технологий, награжден медалью ордена «За заслуги перед Отече-

ством» II степени. По решению научного сообщества НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Михаил Валентинович удостоен золотой медали имени Н.Н. Блохина за выдающийся вклад в развитие онкоиммунологии.

М.В. Киселевский активно занимается преподавательской деятельностью, читает лекции по онкоиммунологии в Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет). Под его руководством выполнено 8 докторских и 27 кандидатских диссертаций.

Редакция журнала

Глубокоуважаемый Михаил Валентинович!

Примите наши сердечные поздравления с 70-летием! Желаем Вам крепкого здоровья, дальнейших профессиональных успехов и реализации всех намеченных планов!

